INDUKTION DER FRUCHTKOERPERBILDUNG DES ASCOMYCETEN SORDARIA MACROSPORA

D i s s e r t a t i o n

zur
Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der
Abteilung für Biologie
an der
Ruhr-Universität Bochum

von

Michael Bahn

aus Wien

Bochum 1976

INDUKTION DER FRUCHTKOERPERBILDUNG DES ASCOMYCETEN SORDARIA MACROSPORA

D i s s e r t a t i o n

zur
Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der
Abteilung für Biologie
an der
Ruhr-Universität Bochum

von
Michael Bahn
aus Wien
Bochum 1976

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 25. März 1976

Referent: Prof. Dr. Bertold Hock

Korreferent: Prof. Dr. Wolfgang Scheuermann

Meinen Eltern

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. Berthold Hock sei an dieser Stelle mein besonderer Dank für die wertvollen Anregungen sowie die ständige Hilfsbereitschaft und Förderung der Arbeit ausgesprochen.

Herrn Professor Dr. Karl Esser erlaube ich mir, für die Ueberlassung der Stämme von Sordaria sowie die großzügige Unterstützung zu danken.

Herrn Dipl.-Biologen R.A. Walk danke ich für die wertvollen Anregungen und Diskussionen.

Zu großem Dank bin ich Frau Ulrike Haberland für die gewissenhafte Assistenz bei der Durchführung der Experimente verpflichtet.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die materielle Unterstützung.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	8
2.1.	Herkunft der verwendeten Substanzen	8
2.2.	Organismus	9
2.3.	Nährmedien	9
2.3.1.	Mais-Medium	10
2.3.2.	Stärke-Medium	10
2.3.3.	Natriumacetat-Medium	10
2.3.4.	Komplettiertes Stärke-Medium	10
2.3.5.	Fructose-Medium I	10
2.3.6.	Fructose-Medium II	11
2.4.	Kulturbedingungen	11
2.4.1.	Stammkulturen	11
2.4.2.	Testkulturen	11
2.5.	Lochtest	11
2.6.	Plattentest	12
2.7.	Anzucht auf Cellophan	13
2.8.	Anzucht für die kinematographischen Untersuchungen	13
2.9.	Nährbodengradienten	13
2.10.	Bestimmung des Trockengewichts	14
2.11.	Bestimmung der Ausbreitungsgeschwindigkeit	14
2.12.	Bestimmung der Perithezienzahl	14
2.12.1.	Manuelle Auszählung	14
2.12.2.	Bildanalysator-Auswertung	15
2.13.	Standardisierung der Test-Medien	16
2.14.	Säulenchromatographie	18
2.15.	Gelfiltration	19

Seite

2.16. Kationenaustauscher 20

2.17. Anionenaustauscher 20

2.18. Dünnschichtchromatographie von Aminosäuren 21

2.19. Maisextrakt 21

2.20. Elektrodialyse 21

2.21. Chloroformextraktion 22

2.22. Molekularsiebtrennung 22

2.23. Ionenaustauschchromatographie 22

2.24. Radioaktive Markierung 23

2.25. Kinematographie 24

2.25.1. Programmablauf des Steuergerätes 25

2.25.2. Funktion der Zeitglieder 25

2.25.3. Klimabox 26

3. ERGEBNISSE 27

3.1. Morphologische Aspekte der Fruchtkörperbildung 27

3.2. Einfluß von Licht, Temperatur, pH-Wert und Nährstoffangebot auf die Fruchtkörperbildung 33

3.3. Induktion der Fruchtkörperbildung durch das Nährstoffangebot 35

3.4. Optimierung des Test-Mediums 37

3.5. Reinigung des Maisextraktes 38

3.6. Auswahl einer für die Perithezienbildung günstigen Kohlenhydrat-Quelle 44

3.7. Kann die Wirkung von L-Arginin durch Maisextrakt erhöht werden? 45

Seite

3.8. Optimierung des synthetischen Mediums 45

3.9. Vergleich der Fruchtkörperbildung auf dem synthetischen Medium mit Stärke bzw. Fructose als Kohlenhydrat-Quelle 49

3.10. Morphologische Aspekte der Faktoren-analysen 49

3.11. Modulation der Perithezienbildung durch L-Arginin auf Fructose-Medium 50

3.12. Spezifität der Wirkung von L-Arginin auf Fructose-Medium 56

3.13. Analyse der Fruchtkörper-Induktion 57

3.13.1. Der Einfluß von L-Arginin und Biotin auf Wachstum und Fruchtkörperbildung 58

3.13.2. Fruchtkörperbildung und Pigmentierung 62

3.13.3. Der Einfluß von L-Arginin und Biotin auf die radiale Ausbreitungsgeschwindigkeit des Mycels 64

3.13.4. Der Einfluß von Biotin auf die Aufnahme von L-Arginin 65

3.13.5. Hemmung der Fruchtkörperbildung 70

3.14. Vergleich der Entwicklung einiger Stämme von Sordaria macrospora auf den Standard-Medien 78

4. DISKUSSION 83

5. ZUSAMMENFASSUNG 102

6. LITERATUR 104

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
bzw.	beziehungsweise
d	Tag
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Aethylendiamintetraessigsäure
Fa.	Firma
5-F.U.	5-Fluoruracil
h	Stunde
min	Minute
M.T.G.	Myceltrockengewicht
p.I.	Isoelektrischer Punkt
RNA	Ribonukleinsäure
Tab.	Tabelle
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel

1. EINLEITUNG

Das Hauptmerkmal der Ascomyceten ist normalerweise der Ascus. Darunter versteht man einen bestimmten Typ von Sporangium, in dem Ascosporen gebildet werden. Mit der Bildung dieser Ascosporen ist die sexuelle Fortpflanzung abgeschlossen. Die biologische Bedeutung der sexuellen Fortpflanzung liegt nur zu einem geringen Teil in der Weitergabe der genetischen Informationen von Generation zu Generation. Es kommt vielmehr entscheidend darauf an, daß dieser Prozeß die Möglichkeit zur Rekombination des genetischen Materials eröffnet. Damit ist eine der Grundvoraussetzungen für die Evolution gegeben. Bis heute sind jedoch die Mechanismen unbekannt, welche die Umsteuerung vom vegetativen Wachstum zur sexuellen Reproduktion kontrollieren.

Durch genetische und entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen konnte an Ascomyceten gezeigt werden, daß die Differenzierung der Geschlechtsorgane und Fruchtkörper durch eine Reihe von Genen reguliert werden kann. Als Beispiel seien folgende Organismen genannt: Glomerella cingulata (McGahen und Wheeler 1951, Wheeler und McGahen 1952, Wheeler, Driver und Campa 1959), Sordaria fimicola (Olive 1958, Carr und Olive 1959), Sordaria macrospora (Esser und Straub 1956, 1958) und Podospora anserina (Esser 1956 a).

Diese morphogenetisch wirksamen Gene zeigen jedoch vielfach eine pleiotrope Wirkung, da sie nicht nur für die Differenzierung von Organen der sexuellen und asexuellen Fortpflanzung verantwortlich sind, sondern auch den Mycelhabitus beeinflussen. Bisher gelang es allerdings noch nicht, die für die einzelnen Entwicklungsschritte verantwortlichen Genprodukte zu charakterisieren.

Da die Ausprägung von morphologischen Merkmalen aber nicht nur vom Genotyp, sondern auch von Außenfaktoren abhängt, ist

eine Analyse der Umweltfaktoren und deren Wirkung auf die Regulation unbedingt erforderlich.

Nach Klebs (1900) sind "Wachstum und Fortpflanzung Lebensprozesse, die bei allen Organismen auf verschiedenen Bedingungen beruhen; bei allen niederen Organismen entscheiden wesentlich äußere Bedingungen, ob Wachstum oder Fortpflanzung stattfindet". Seither sind eine Reihe von Fakten über die Fortpflanzung der Pilze publiziert, die diese Feststellung von Klebs in seiner allgemeinen Form bestätigen.

Aus der Literatur ist bekannt, daß einige der Umweltfaktoren eine spezifische Wirkung auf die Regulation der reproduktiven Phase bei bestimmten Vertretern der Ascomyceten ausüben. Besonders gut untersucht sind bei den Ascomyceten die Außenfaktoren Licht, Temperatur, Nährstoffangebot und Hormone.

1. Licht: Nach Baker und Ware (1962) induziert Licht bei Hypomyces solani die Bildung von Perithezienanlagen.
   Bei Botryotinia squamosa hängt es von der Qualität des Lichtes ab, ob eine Induktion der asexuellen oder der sexuellen Fortpflanzung stattfindet (Berquist und Lorbeer 1972). Bei diesem Pilz wird durch Tageslicht die sexuelle Reproduktion stimuliert, während für die Konidienbildung zusätzlich nahes UV notwendig ist.
   Die Mindestdauer der Bestrahlung mit Licht kann bis zu 50 d zu je 12 h betragen, wie es für die Bildung von Ascosporen bei Leptosphaeria avenaria von Hongenson und Hosford (1971) gezeigt werden konnte.
   Wird jedoch eine Wellenlänge von 560 nm unterschritten, so kann es zu einer Induktion von Konidien kommen.
   Bei Gelasinospora reticulispora (Fukuda, Inoue und Furuya 1971; Inoue und Furuya 1970) sind für die Bildung von reifen Perithezien vor der Bestrahlung mit weißem Licht, Dunkelperioden (30 h) notwendig. Außerdem konnten Inoue und Furuya (1974 a,b) zeigen, daß 3 verschiedene photosensitive Phasen des Mycels existieren.

Der gegenwärtige Stand der Forschung erlaubt es bisher noch nicht, die kausalen Zusammenhänge zu verstehen. Es werden jedoch unterschiedliche, von Licht aktivierte Mechanismen der Regulation von asexuellen und sexuellen Prozessen dis-

kutiert, außerdem sind Untersuchungen, die Photorezeptoren zu charakterisieren, im Gange.

2. Temperatur: Von Neurospora crassa (Westergaard und Mitchell 1947) ist bekannt, daß die Fruchtkörperbildung durch Temperaturen über 35°C unterbunden wird. Genauere Untersuchungen von Westergaard und Hirsch (1954) sowie Hirsch (1954) ergaben, daß sowohl die Protoperithezienbildung als auch die Tyrosinase-Aktivität durch die erhöhte Temperatur gehemmt werden. Dieser Befund wird noch durch die fehlende Entwicklung von Protoperithezien bei Tyrosinase-negativen Mutanten bestätigt (Barbesgaard und Wagner 1959). Da die Bildung von normalen Protoperithezien offenbar mit einer Verringerung der Melanin-Produktion gekoppelt ist, wurde ein Kausalzusammenhang zwischen Tyrosin-Metabolismus und der Induktion von Fruchtkörpern vermutet. Die Hypothese, daß eine oder mehrere Vorstufen von Melanin einen hormonellen Effekt ausüben, konnte durch die Experimente von Hirsch (1954), die darauf abzielten, morphogenetisch wirksame Substanzen aus Extrakten von N. crassa zu gewinnen, nicht bestätigt werden. Aufgrund dieser Ergebnisse versuchte Turian (1960), Unterschiede im Metabolismus von Protoperithezien-bildenden Kulturen und nur Konidien-bildenden Kulturen nachzuweisen. Die Anhäufung von Succinat in zellfreien Extrakten des Konidien-bildenden Mycels wies auf eine Blockierung der Succinat-Dehydrogenase hin. Dies wurde durch die auf 20% gesunkene Aktivität dieses Enzyms bestätigt.
Daraus konnte geschlossen werden, daß die Protoperithezienbildung nur dann abläuft, wenn der Krebs-Zyklus vollständig funktioniert, während eine Läsion im Krebs-Zyklus die Bildung von Konidien stimuliert. Eine Bestätigung dieser Hypothese erbrachten Versuche mit dem Krebs-Zyklus-Inhibitor Malonat, durch das die Konidienbildung gefördert, die Protoperithezienbildung hingegen reprimiert wird (Turian 1962).
Die Induktion des Glyoxylsäure-Zyklus als Alternative zum Krebs-Zyklus durch Verwendung von Acetat als C-Quelle bewirkt ebenso eine Konidienbildung, jedoch keine Differenzierung und Protoperithezien (Turian 1966).
Analoge Ergebnisse wurden bei N. tetrasperma von Viswanath-Reddy und Turian (1975) gefunden.

In der Mehrzahl der Fälle werden jedoch Phänomene beschrieben, die einen entscheidenden Einfluß des Nährmediums auf die Fruchtkörperbildung von Ascomyceten vermuten lassen.

3. Nährstoffangebot: Als essentielle Faktoren werden häufig Calcium [Ceratocystis fimbriata (Campbell 1960), Chaetomium spec. (Basu 1951), Panus tigrinus (Faro 1972)], Ammonium-Ionen [Nectria haematococca (Qureshi und Page 1972)], Borsäure [Sordaria fimicola (Turian 1955)] oder Phosphorsäureester von Hexosen [Melanospora destruens (Hawker 1948)] postuliert. Ebenso wird folgenden Faktoren eine stimulierende Wirkung zugeschrieben: Dem C/N-Verhältnis [Neurospora crassa (Westergaard und Mitchell 1947), Sordaria fimicola (Hall 1971)],der Kohlenhydrat-Zusammensetzung und -Konzentration [Melanospora destruens(Hawker 1939), Podospora anserina (Esser 1956 b)], verschiedenen Vitaminen wie Thiamin und Biotin [Chaetomium cochloides (Hawker 1942), Chaetomium convolutum (Lilly und Barnett 1949), Sordaria fimicola (Barnett und Lilly 1947 a, Bretzloff 1954, Lilly und Barnett 1947), Ceratostomella fimbriata (Robbins und Ma 1942, Barnett und Lilly 1947 b), Ceratocystis variospora(Campbell 1958)] sowie einigen Aminosäuren wie Phenylalanin und Tyrosin [Hypomyces solani (Hix und Baker 1964), Neurospora crassa (Dicker, Oulevey und Turian 1969), Nectria haematococca und Hypomyces solani (Qureshi und Page 1972)] und verschiedene Sterole [Sordaria und Phytophthora (Elliot 1969)].

In Analogie zu den bekannten Beispielen der Myxomyceten [Dictyostelium (Bonner 1971)] und Phycomyceten [Allomyces (Nutting, Rapoport und Machlis 1968), Achlya (Raper und Haagen-Smit 1942, McMorris und Barkesdale 1967) und Mucor (Gooday 1968; Austin, Bu'Lock und Gooday 1969)], bei denen die Existenz von (Sexual-)Hormonen nachgewiesen ist, werden auch bei einigen Vertretern der Ascomyceten derartige Substanzen postuliert.

4. Hormone: So konnte zwar Bistis (1956, 1957) bei Ascobolus stercorarius indirekte Hinweise für eine hormonelle Steuerung der sexuellen Fortpflanzung erbringen, indem er das gerichtete Wachstum von Trichogynen und die sexuelle Aktivierung von Oidien demonstrierte (Turian 1966); eine Charakterisierung der Substanz(en) gelang bis jetzt noch nicht.
Auch bei Neurospora crassa rechnet man mit morphogenetisch wirksamen Substanzen, da durch den Zusatz von Kulturfiltrat-Extrakten aus fertilisierten Mycelien die Zahl der Protoperithezien bei bestimmten Kreuzungen erhöht werden kann (Islam und Weijer 1972, Islam 1973). Ueber die Charakterisierung dieses stimulierenden Prinzips gibt es zur Zeit unterschiedliche Ergebnisse. Gooday (1974) berichtet von einem ungesättigten Kohlenwasserstoff, mit einem Molekulargewicht um 350, während Vigfusson und Cano (1974) einem Protein die Stimulierung der Fruchtkörperbildung zu-

schreiben. In jedem Fall werden jedoch durch diese Substanzen nur quantitative, aber keine qualitativen Effekte induziert. Bisher ist nur bei Saccharomyces cerevisiae die Charakterisierung einer morphogenetisch wirksamen Substanz (α-Faktor) gelungen (Duntze, Machay und Manney 1970; Duntze, Stötzler, Bücking-Throm und Kalbitzer 1973).
Auf der Suche nach spezifischen Genprodukten wurde von Nasrallah und Srb (1973) bei Neurospora crassa, N. sitophila und N. tetrasperma aufgrund von elektrophoretischen Analysen die Existenz eines phasenspezifischen Proteins in Extrakten von Fruchtkörpern nachgewiesen. Dieses Protein ist zwar nicht bei allen getesteten Stämmen identisch (unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit im Gel), doch scheinen die varianten Formen in Struktur und Funktion homolog zu sein.

Somit sind bei den Ascomyceten eine Reihe von genetischen, biochemischen und physiologischen Aspekten der sexuellen Differenzierung bekannt. Der kausale Zusammenhang ist jedoch noch weitgehend unklar. Dies mag teilweise daran liegen, daß für diese Untersuchungen häufig Systeme verwendet wurden, bei denen nur quantitative, aber keine qualitativen Effekte induziert werden konnten, oder aber verhältnismäßig unspezifisch wirkende Faktoren für die Induktion von morphogenetischen Vorgängen verwendet wurden.

Ein günstiges System für die Analyse entwicklungsphysiologischer Prozesse stellt der monözische, selbstkompatible Ascomycet Sordaria macrospora dar. Die Sequenz der sexuellen Morphogenese dieses Pilzes kann in einzelne, morphologisch gut definierte Entwicklungsschritte eingeteilt werden, außerdem existieren eine Reihe von Mutanten, die auf den verschiedenen Entwicklungsschritten blockiert sind.

Der Entwicklungszyklus von Sordaria macrospora Auersw. wurde von Esser und Straub (1958), Esser und Kuenen (1965) sowie Olive (1974) ausführlich beschrieben:

Ungefähr 20 h nach der Beimpfung erscheinen die weiblichen Geschlechtsorgane (Ascogone)als haken- oder schraubenförmige Ausstülpungen der Hyphen. Männliche Geschlechtsorgane und eine asexuelle Fortpflanzung durch Konidiosporen oder andere Fortpflanzungseinheiten sind bei diesem Organismus nicht bekannt. An ein Ascogon legen sich im Verlauf der weiteren Entwicklung sterile benachbarte Hyphen an, die sich stark verzweigen und das Ascogon umhüllen. Diese Strukturen werden Protoperithezien genannt und entwickeln sich innerhalb von 3 d zu flaschenförmigen Perithezien. Der ganze Entwicklungszyklus dauert ca. 7 d. Wie Esser und Straub (1958) anhand von genetischen Experimenten nachweisen konnten, enthält das Ascogon meist 2 Kernpaare. Nach erfolgter konjugierter Kernteilung wandern die Kernpaare zu den ascogenen Hyphen, welche vom Ascogon ausgebildet werden. Anschließend erfolgt die Entwicklung der Asci mit je 8 linear angeordneten Sporen. Im Perithezium erfolgt die Bildung der Sporen sukzedan, die nach der Reife ausgeschleudert werden.

Aufgrund von umfangreichen genetischen Untersuchungen konnte von Esser und Straub (1958) nachgewiesen werden, daß die Fruchtkörperbildung bei Sordaria macrospora durch mindestens 15 nichtallele Gene reguliert wird. Die für diese Experimente verwendeten Defektmutanten weisen Veränderungen im Fortpflanzungsverhalten auf, da die Bildung der Perithezien in einer für jede Mutante charakteristischen Weise auf verschiedenen Stufen blockiert ist. Die analysierten Gene zeigen vielfach pleiotrope Wirkungen, da mit den Defekten im Entwicklungszyklus auch häufig Veränderungen des Mycelcharakters, der Perithezienform und -größe sowie der Sporenfarbe verbunden sind. Eine Kompensation der Entwicklungsdefekte kann durch die Bildung eines Heterokaryons mit nichtallelen Mutanten erzielt werden. Bisher gelang es jedoch noch nicht, durch Zusatz von Genprodukten, die aus Mycelextrakten des Wildstammes gewonnen wurden, die genetischen Defekte der einzelnen Mutanten zu kompensieren und den vollständigen Entwicklungszyklus zu induzieren (Esser und Straub 1958).

Obwohl umfangreiche Informationen über die genetischen und entwicklungsgeschichtlichen Verhältnisse von S. macrospora vorliegen, gibt es bisher keinerlei Anhalts-

punkte, wie und in welcher Form Außenfaktoren (chemischer Natur) den Entwicklungszyklus dieses Pilzes beeinflussen können. Dies ist hauptsächlich darauf zurückzuführen, daß bisher noch nie ein synthetisches Medium für die Anzucht verwendet wurde.

Ziel dieser Arbeit war es, folgende Fragen zu klären:

1. Ermittlung exakter, definierter Bedingungen für einen optimalen Ablauf des Entwicklungszyklus von S. macrospora.
2. Identifikation der Faktoren (organismuseigene mit hormonellem Charakter, Umweltfaktoren und Substanzen chemischer Natur) und deren Wechselwirkungen, welche die Umsteuerung vom vegetativen Wachstum zur sexuellen Reproduktion regulieren.
3. Nachweis einer sensitiven Phase für die Induktion der Fruchtkörperbildung.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Herkunft der verwendeten Substanzen

Fa. Amersham-Buchler, Braunschweig: L-U^{14}C-Arginin

Fa. Beckmann Instruments Inc., Fullerton, Calif. USA:
PPO 2,5-Diphenyloxazol,
POPOP 1,4-bis-2-(5-Phenyloxazolyl)-Benzen

Fa. Diamalt, München: Maltzin

Fa. Fortmann und Wiegens, Gelsenkirchen: "Indu"-Einmachhaut

Fa. Kleine, Herne: Brillenspray Kapunkt

Fa. Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden:
Sephadex G-10

Fa. Serva, Heidelberg: Agar-Agar, alle Aminosäuren,
Dowex 50Wx12, Dowex 1x2 und ß-Phenyläthylamin

Fa. Merck, Darmstadt: Alle anderen Reagenzien, pro analysi

2.2. Organismus

Für die Experimente wurden die in Tab. 1 angeführten Stämme von Sordaria macrospora Auersw. (Sammlung Prof. Esser, Lehrstuhl für Allgemeine Botanik, Ruhr-Universität Bochum) verwendet.

Tab. 1: Beschreibung der verwendeten Stämme von Sordaria macrospora Auersw. auf Mais-Medium:

Stamm	Fortpflanzungsverhalten	Mycel-Farbe
K^+h(hell)	fertil, Perithezien	farblos
K^+d(dunkel)	fertil, Perithezien	braun
lu	fertil, Perithezien, gelbe Sporen	bräunlich
pl	Protoperithezien	bräunlich
pal	Protoperithezien	hellbraun
pr	Protoperithezien	farblos
f_1	Protoperithezien	bräunlich
spd	Ascogone	dunkelbraun
me	Ascogone	farblos
cit	Ascogone	gelblich

Für die Experimente wurde im Normalfall der Stamm K^+d verwendet.

2.3. Nährmedien

Die Komponenten der Medien wurden in bidestilliertem Wasser gelöst und 1,5% Agar-Agar zugesetzt. Der pH wurde mit KOH auf 6,0 eingestellt und die Medien 30 min bei 121°C autoklaviert. Nach Abkühlung auf ca. 60°C wurden sterile Plastik-Petrischalen (Durchmesser 8,5 cm) mit je 20 ml Medium gefüllt. Die Angaben der zugesetzten Mengen beziehen sich (mit einer Ausnahme, 2.3.3.) auf 1 Liter.

2.3.1. Mais-Medium:

1	l Maiswasser
1	g Maltzin

Das Maiswasser wurde durch eine 24 stdg. Extraktion einer 2,5%igen Maisschrotsuspension bei 50°C gewonnen. Die Suspension wurde filtriert (Schleicher u. Schüll, Filter 595), das Filtrat als Maiswasser verwendet.

2.3.2. Stärke-Medium:

15	g Stärke, löslich

2.3.3. Natriumacetat-Medium:

1	l Maiswasser
4,7	g Maltzin
4,4	g Natriumacetat
2,28	ml 10% KOH

2.3.4. Komplettiertes Stärke-Medium:

15	g Stärke, löslich	
3	g KNO_3	(29,67 mM)
1	g KH_2PO_4	(7,35 mM)
0,5	g $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	(2,02 mM)
0,2	mg $ZnSO_4$	(0,69 µM)
12,5	µg Biotin	(51,14 nM)

2.3.5. Fructose-Medium I:

15	g D(-)Fructose	(83,25 mM)
3	g KNO_3	(29,67 mM)
1	g KH_2PO_4	(7,35 mM)
0,5	g $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	(2,02 mM)
0,2	mg $ZnSO_4$	(0,69 µM)
0,2107	g L-Arginin. HCl	(1,00 mM)
6,0	µg Biotin	(24,55 nM)

2.3.6. Fructose-Medium II:

12	g D(-)Fructose	(66,66 mM)
2,2	g KNO_3	(21,75 mM)
1	g KH_2PO_4	(7,35 mM)
0,5	g $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	(2,02 mM)
0,2	mg $ZnSO_4$	(0,69 µM)
0,2107	g L-Arginin·HCl	(1,00 mM)
6,0	µg Biotin	(24,55 nM)

2.4. Kulturbedingungen

2.4.1. Stammkulturen

Die Stammkulturen wurden auf Mais-Medium angezogen, auf dem nach 7 d die fertilen Stämme Perithezien bildeten. Die Aufbewahrung erfolgte im Kühlschrank bei 4°C. Im Abstand von 3 Monaten wurden die Stämme regeneriert, indem mit Meiosporen neue Stammkulturen angelegt wurden.

2.4.2. Testkulturen

Von den Stammkulturen wurde jeweils die höchste Entwicklungsstufe der Stämme auf Stärkemedium überimpft. Auf diesem Minimalmedium (vgl. Tab. 2) wurde der Entwicklungszyklus der Stämme beträchtlich beeinflußt. Aus diesen Kulturen wurden nach 5 d Agarwürfel (ca. 5x5x5 mm) ausgeschnitten, die als Impfstücke auf die jeweiligen Testmedien übertragen wurden. Durch diese Methode konnte eine unkontrollierte Nährstoffanreicherung vermieden werden. Die Kulturen wurden in der Mitte beimpft und bei 27°C±0,5° bebrütet.

2.5. Lochtest

Petrischalen wurden im Zentrum beimpft, mit 25 mm Abstand vom Impfstück wurden zwei gegenüberliegende Löcher (Durchmesser 5 mm) in den Nährboden gestanzt. 48 h nach der Beimpfung wurden 0,05 ml sterilfiltrierte Testlösung in das eine, die gleiche Menge Wasser in das andere Loch pipet-

tiert. Bei mehrmaliger Zugabe wurde entweder nach 48 und 96 h oder nach 48, 72 und 96 h die Testlösung zugesetzt.

Tab. 3: Vergleich der Entwicklung auf Voll- und Minimal-Medium. Zeit der Beobachtung: 14 d.

Stamm	Mais-Medium	Stärke-Medium
K⁺h	Perithezien	Perithezien mit defekten Asci
K⁻d	Perithezien	Protoperithezien
lu	Perithezien	Perithezien mit defekten Asci
pl	Protoperithezien	Protoperithezien
f_1	Protoperithezien	kleine Protoperithezien
pal	Protoperithezien	Protoperithezien
pr	kleine Protoperithezien	Ascogone
mit	kleine Protoperithezien	Mycel
me	Protoperithezien	kleine helle Protoperithezien
spd	Ascogone	Mycel

2.6. Plattentest

Das Nähr-Medium wurde mit den zu testenden Substanzen ergänzt, nach der Einstellung des pH-Werts autoklaviert und in Plastik-Petrischalen ausgegossen. Zur Ueberprüfung eventueller Autoklaviereffekte wurden die Substanzen in Wasser gelöst, sterilfiltriert, mit dem autoklavierten Agar nach Abkühlung auf 42°C gemischt und in sterile Petrischalen gegossen. Die Beimpfung und Inkubation erfolgte wie oben.

2.7. Anzucht auf Cellophan

Cellophan-Scheiben ("Indu") mit einem Durchmesser von 85 mm wurden ausgeschnitten, in 5 mM EDTA 20 min gekocht, mit Wasser gespült, weitere 3x mit bidestilliertem Wasser ausgekocht und in Wasser autoklaviert.

Die Membranen wurden unter sterilen Bedingungen auf den Nährboden in den Petrischalen aufgebracht, glattgestrichen und überschüssiges Wasser entfernt. Darauf erfolgte eine Inkubation der Petrischalen bei 35°C über 48 h, um eventuell infizierte Platten zu eliminieren.

2.8. Anzucht für die kinematographischen Untersuchungen

Die Lebendbeobachtungen am Mikroskop wurden in einer Agar-Kammer (Heunert, 1973) vorgenommen. Eine V_2A-Platte (30x75x1 mm) wurde mit einem quadratischen Durchbruch versehen (24x24 mm). Ein steriles Deckglas (30x30 mm) wurde auf den Rahmen gelegt, ein anderes steriles Deckglas (24x24 mm), auf dem sich ein 0,8 mm dicker, beimpfter Agar-Block befand, wurde in den Ausschnitt der Metallplatte gelegt. Die Abdichtung der Deckgläser konnte mit Vaseline vorgenommen werden. Die Konstanthaltung der Temperatur erfolgte mit Hilfe der Klimabox.

2.9. Nährbodengradienten

Ein Liter Medium wurde in eine Glasschale (240x50 mm) gefüllt, die nach dem Autoklavieren schräg gestellt wurde, so daß der Nährboden an der höchsten Stelle gerade noch den Boden der Schale bedeckte. Nach Erstarren des Mediums wurde die Glasschale wiederum waagerecht gestellt und 1 l Wasseragar (1,5%), der auf 52°C abgekühlt war, eingefüllt. Die Beimpfung erfolgte in der Mitte der Schale.

2.10. Bestimmung des Trockengewichts

Plastik-Petrischalen (Durchmesser 8,5 cm) mit je 20 ml Nähr-Medium wurden in der Mitte beimpft und bei 27°C inkubiert. In Abständen von 24 h wurde der Agar von je 4 Platten in 100 ml Erlenmeyerkolben mit je 50 ml Wasser im kochenden Wasserbad aufgeschmolzen. Dann wurde die Flüssigkeit durch gewichtskonstante Filter (Macherey u. Nagel, Düren, MN 617) genutscht, jeweils mit 100 ml heißem Wasser gespült und 16 h bei 80°C getrocknet. Nach einer Stunde Abkühlung im Exsikkator wurden die Filter bei Gewichtskonstanz zurückgewogen und das Trockengewicht berechnet. Durch das Aufschmelzen des Nähr-Mediums wurde das Mycel ausgewaschen, so daß ein um 25±2% geringeres Trockengewicht gemessen wurde.

2.11. Bestimmung der Ausbreitungsgeschwindigkeit

Zur Bestimmung des radialen Wachstums des Mycels wurden 2 senkrecht aufeinander stehende Geraden durch den Mittelpunkt (Impfpunkt) der Petrischale gezeichnet und in Abständen von 2 h auf den Geraden der Durchmesser der Kolonie gemessen.

2.12. Bestimmung der Perithezienzahl

2.12.1. Manuelle Auszählung

Die Petrischalen wurden nach 5, 7, 9 und 11 d Inkubation im Durchlicht fotografiert, das Negativ mit einem Diaprojektor auf eine weiße Platte projiziert, so daß der Durchmesser der Petrischale 73 cm betrug. Auf der Platte waren 4 senkrecht aufeinander stehende Kreissektoren (je 9°) aufgezeichnet (Abb. 1 a). Mit einem Farbstift wurden die Fruchtkörper ab einem Mindestdurchmesser von 200 µm markiert und gezählt. Die Summe der 4 Sektoren wurde mit 10 multipliziert. Die statistische Zuverlässigkeit dieser Auszählmethode von 10% der gesamten Fläche wird in Tab. 3 exemplarisch dargestellt.

Tab. 3: Anzahl der Fruchtkörper, die sich durch die Auszählung von 10% der Fläche ergaben (vgl. Abb. 1 a). Um die statistische Zuverlässigkeit der Auszählung zu überprüfen, wurde die gesamte Zahl der Fruchtkörper gezählt und mit den Werten der Auszählung von 10% der Fläche verglichen. Nach jeder Zählung der 4 Sektoren wurde die Schablone um einen Winkel von 9° gedreht.

Zahl aller Fruchtkörper pro Platte	Σ	9655,0
Mittelwert der Anzahl, wenn nur 10% der Fläche gemessen werden	μ	965,5
Anzahl der Fruchtkörper pro 10% der Fläche 957, 945, 959, 991, 981, 984, 935, 948, 979, 976		
Standardabweichung	s	19,0
Variationskoeffizient	V	1,98%

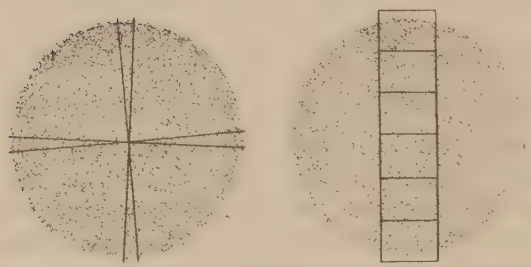
Die Ergebnisse zeigen, daß der erhaltene Fehler dieser Auszählmethode in akzeptablen Grenzen liegt. Die Berechnung des Mittelwerts $\bar{x}$, der Standardabweichung s und der Standardabweichung des Mittelwerts $s_{\bar{x}}$ wurden nach den Angaben von Sachs (1971) durchgeführt.

2.12.2. Bildanalysator-Auswertung

Nachdem die manuelle Auszählung der Perithezien sowohl sehr zeitraubend als auch nur ab einer minimalen Größe (Durchmesser 200 µm) möglich war, wurde eine Auswertung mit dem Bildanalysator Omnicon PAS der Fa. Bausch u. Lomb, Unterföhring, vorgenommen. Die Negative der fotografierten Petrischalen wurden auf den Kreuztisch eines Mikroskops gespannt. Von den Objektiven wurde die Vergrößerung 2,5x gewählt, da mit dieser Vergrößerung eine gute Auflösung der gebildeten Fruchtkörper zu erreichen war, das Korn des Filmes (Agfapan 25) die Messung jedoch nicht stören konnte. Der Bildausschnitt des Negativs, der von dem Analysator erfaßt wurde,

betrug 2,938 x 4,377 mm. Wie aus Abb. 1 b hervorgeht, wurden pro Platte 6 Felder ausgemessen, wobei 33% der Versuchsplatte erfaßt wurden. Der an den Bildanalysator angeschlossene Rechner bestimmte die Gesamtfläche der als Objekt erkannten Teilchen, außerdem wurde noch eine Größenklassifizierung dieser Teilchen durchgeführt.

Abb. 1: Bestimmung der Fruchtkörperzahl
a) Manuelle Auszählung: Die Fruchtkörper in den 4 senkrecht aufeinander stehenden Sektoren (10% der Gesamtfläche) wurden ausgezählt.
b) Messung durch den Bildanalysator: Die als Objekt erkannten Teilchen in den 6 Meßfeldern (33% der Gesamtfläche) wurden vom PAS ausgewertet.



a) b)

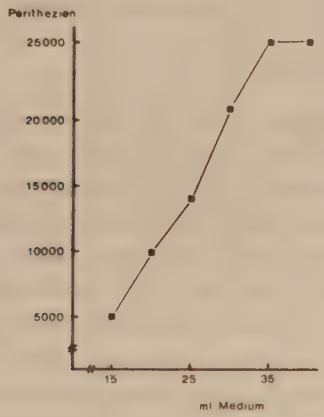
2.13. Standardisierung der Test-Medien

Um die Reproduzierbarkeit der quantitativen Erfassung der Perithezienzahl zu gewährleisten, mußte eine Standardisierung der Test-Medien sowie der Beimpfung vorgenommen werden:

1. Sterilisation: Eine sterilfiltrierte Lösung der Komponenten des Fructose-Mediums I wurde mit autoklaviertem Agar gemischt und in sterile Petrischalen gegossen. Ebenso wurden alle Bestandteile nur autoklaviert und in Schalen gegossen. Ein Vergleich der unterschiedlich sterilisierten Medien zeigte, daß weder qualitative noch quantitative Unterschiede auftraten.

2. Nährmedienhöhe: Plastik-Petrischalen wurden mit 15, 20, 25, 30, 35 und 40 ml Fructose-Medium I gefüllt, wobei jeweils 2 Parallelansätze erstellt wurden. Die manuelle Auszählung der Perithezien erfolgte nach 7 d. Abb. 2 zeigt den Einfluß der Höhe des Nähr-Mediums auf die Fruchtkörperbildung.

Abb. 2: Fruchtkörperbildung (= Anzahl der Perithezien pro Testplatte) nach 7 d in Abhängigkeit von der Höhe des Nähr-Mediums. Bei 15 ml Medium betrug die Höhe 2,6 mm, bei 40 ml 7,1 mm. Von jeweils 2 Ansätzen wurden die Mittelwerte dargestellt.



Es zeigte sich, daß ab einer Nährmediumhöhe von 6,1 mm (35 ml) eine Sättigung bezüglich der Fruchtkörperbildung erreicht wurde. Die Geschwindigkeit der Fruchtkörperbildung wurde durch die unterschiedliche Höhe des Mediums allerdings nicht beeinflußt.

3. Beimpfung: Von Stärke-Medium-Platten (Testkulturen) wurde an 5 verschiedenen Stellen zwischen Impfpunkt und Schalenrand im Abstand von 8 mm Mycelstücke entnommen und auf Fructose-Medium I übertragen. Das Alter der Testkulturen variierte zwischen 3 und 10 d.

Es zeigte sich, daß nur durch Impfstücke, die aus dem Kolonierand ausgestanzt worden waren, eine geringere Fruchtkörperzahl hervorgerufen wurde.

Für eine quantitative Bestimmung der Fruchtkörperzahl waren folgende Bedingungen zu erfüllen:

a. Alle Medien wurden nach 30 min unter strömendem Dampf bei 121°C 20 min autoklaviert.

b. Pro Testplatte wurden immer 20 ml Medium eingefüllt.

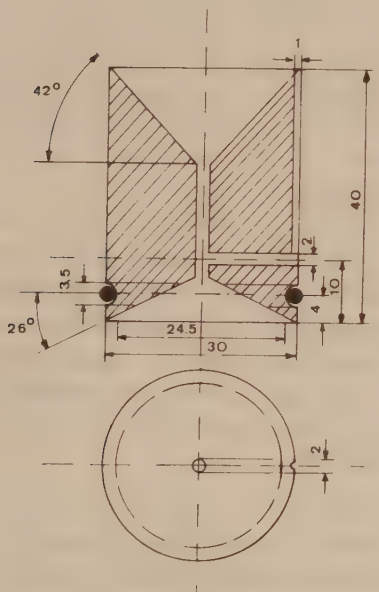
c. Für die Beimpfung wurden immer 5 d alte Testkulturen benutzt (nach weniger als 3 d waren die Platten vollständig von Mycel überwachsen).

2.14. Säulenchromatographie

Da die im Handel befindlichen Säulen aus anwendungstechnischen Gründen unbefriedigend erschienen, wurden Säulen aus Plexiglas hergestellt, die zu beliebigen Längen gekoppelt oder in Serie geschaltet werden konnten. Außerdem war ein Betrieb mit einem Ueberdruck von 4 atü möglich. Die Länge der Rohre (40x5 mm) variierte zwischen 200 und 500 mm. Mit Zwischenstücken konnten die einzelnen Rohre miteinander verbunden werden. Mit Hilfe eines Adapters (Abb. 3) erfolgte die Probenaufgabe und die Gradienten-Elution. Ueber den stumpfen Konus (unten) wurde ein feinmaschiges Teflonnetz (Pharmacia) gelegt und mit dem Dichtungsring gespannt gehalten. Der Kopfteil der Säule besaß zwei Eingänge, von denen der eine über einen Teflonschlauch mit der horizontalen Bohrung des Adapters zwischen den beiden konischen Enden verbunden war. Von außen wurde mit einer Schlauchverbindung eine Kolbenspritze angeschlossen, mit der die Probe über den Adapter auf die Säulenfüllung aufgetragen werden konnte. Mit etwas Luft wurde die Schlauchleitung bis zum Adapter geleert, so daß eine quantitative Auftragung der Probe gewährleistet war. Außerdem erfolgte über diese Leitung der Zufluß des Gradienten, während das Elutionsmittel immer über den zweiten Einlaß des Kopfteils zugeführt wurde.

Mit Hilfe des Adapters konnte trotz geringer Säulenfüllung eine exakte Probenauftragung und Gradientenelution vorgenommen werden. Außerdem war es möglich, unter Ueberdruck mehrere Säulen direkt in Serie zu eluieren, da durch diese Art des Adapters keine Dichtungsprobleme bei erhöhtem Druck auftreten konnten.

Abb. 3: Säulenadapter M 1:1,2:
Stumpfer Konus nach unten auf die Packung der Säule, Probenaufgabe über die horizontale Bohrung.



2.15. Gelfiltration

Das gequollene Gel (Sephadex G-10) wurde 4 h im Wasserbad bei 60°C erwärmt und mehrmals dekantiert, bis der Ueberstand klar war. Ein großer Trichter wurde mit einem Gummistopfen auf die Säule aufgesetzt, das erwärmte Elutionsmittel (Wasser 60°C) evakuiert und vorsichtig in die Säule gegossen, bis der Trichterhals mit Elutions-

mittel gefüllt war. Die Säulenfüllung wurde durch wechselseitiges Gießen in 2 Bechergläser dispergiert, evakuiert und noch einige Male dispergiert. Dieser recht dicke Brei wurde vorsichtig, ohne Luftblasen mitzureißen, an der Trichterwand entlang gegossen und mit einem langsam laufenden Flügelrührer gerührt. Abriebschäden durch diese Behandlung waren bei Sephadex G-10 nicht festzustellen. Danach wurde der Auslauf geöffnet und mit der dreifachen Elutionsgeschwindigkeit die Säule gepackt (ca. 1 Tropfen pro Sekunde). Nach der Packung wurden die Säulen mit einer Dextran- und Adenosin-Lösung (je 1%) geeicht. Das Eluat wurde in Fraktionen zu 10 ml mit einem LKB Ultrorac II Fraktionskollektor aufgefangen, der mit einem Uvicord II und einem LKB Punktschreiber (Stockholm, Schweden), ausgerüstet war.

2.16. Kationenaustauscher

Durch Digerieren mit 2 M HCl wurde der Kationenaustauscher Dowex 50 Wx12, mesh 50-100 in die H^+-Form überführt. Der Ionenaustauscher wurde in eine Plexiglassäule (vgl. Abschnitt 2.13.) 180 mm hoch gefüllt. Danach wurde solange mit Wasser gespült, bis der pH des Eluats 5,8 betrug.

2.17. Anionenaustauscher

Der Anionenaustauscher Dowex 1x2, mesh 200-400 wurde in der dreifachen Menge Wasser suspendiert, gerührt und mehrmals dekantiert, bis der Ueberstand klar war. Dann wurde das Harz in 2 M HCl suspendiert und unter Rühren auf 100°C erhitzt. Nach einstündiger Abkühlung wurde der gelbe Ueberstand verworfen. Die HCl-Behandlung wurde solange fortgesetzt, bis der Ueberstand klar war. Anschließend wurde mit dem Harz eine Plexiglassäule gefüllt (180 mm). Um das Harz in die Formiat-Form zu überführen, wurde mit der achtfachen Menge 1 M Natriumformiat-Lösung und danach mit der zweifachen Menge 0,1 M Ameisensäure gespült. Anschließend wurde solange mit Wasser gespült, bis das Eluat einen pH von 5,8

erreichte. Die Säulenchromatographie wurde im Kühlraum bei 5°C durchgeführt. Die Tropfgeschwindigkeit der Molekularsiebsäulen betrug ca. 1 Tropfen pro 3 Sekunden. Die Ionenaustauschersäulen wurden mit einer peristaltischen Pumpe eluiert, wobei die Tropfgeschwindigkeit 1 Tropfen pro Sekunde betrug.

2.18. Dünnschichtchromatographie von Aminosäuren

Auf DC-Alufolien-Cellulose wurden je 0,5 µl Testlösung (1 mM Aminosäure-Lösung bzw. Eluat des Kationenaustauschers) aufgetragen. Die Entwicklung erfolgte eindimensional aufsteigend im Laufmittel I: 28 Teile Lösung A (35 ml n Butanol + 35 ml Aceton) + 12 Teile Lösung B (7 ml Eisessig + 23 ml Wasser). Nach Beendigung der Trennung wurde das Laufmittel bei 90°C abgedampft, die Platte mit Ninhydrin-Lösung (0,5 g Ninhydrin in 98 ml 96% Aethanol + 2 ml Eisessig) besprüht und 10 min bei 90°C erhitzt.
Für die Trennung von Arginin, Citrullin, Ornithin, Agmatin und Putrescin wurden nach Zolg und Ottow (1974) folgende Laufmittel verwendet:

II:	n Butanol:Aceton:Diäthylamin:Wasser	10:10:2:5
III:	n Butanol:Aceton:Wasser	4:1:5
IV:	Phenol:Wasser:Ammoniak (0,91)	100:20:0,3

2.19. Maisextrakt

Extraktion: Eine 12,5%ige Maisschrotsuspension wurde 48 h bei 60°C extrahiert, danach filtriert. Das Filtrat wurde am Rotationsverdampfer im Verhältnis 80:1 eingeengt und bei 27.000 g 10 min (+4°C) zentrifugiert.

2.20. Elektrodialyse

Die Elektrodialyse wurde in einem Plexiglaszylinder (50 mm Durchmesser, 400 mm Höhe) durchgeführt. An die Wand des Zylinders war die Kathode (Platindraht 0,4 mm Durchmesser, 300 mm Länge) geklebt, die durch 2 Plexiglasstäbe (2 mm Durchmesser) geschützt wurde. 10 ml konzentrierter Mais-

extrakt (ca. 3 g Trockensubstanz) wurden mit Wasser auf 100 ml gebracht und in einen Dialyseschlauch (20 mm Durchmesser, 300 mm Länge) gefüllt. Als Anode wurde ein Platindraht (0,4 mm Durchmesser, 300 mm Länge) in den Dialyseschlauch gesteckt. Die Elektrodialyse erfolgte gegen 650 ml Wasser bei 200 mA über 7 h. Die Flüssigkeit des Kathodenraumes wurde durch einen Magnetrührer gerührt, die Temperatur der beiden Flüssigkeiten erreichte 40°C.

2.21. Chloroformextraktion

Die Kathodenflüssigkeit wurde nach der Elektrodialyse auf 10 ml mit einem Rotationsverdampfer eingeengt, mit 10 ml Chloroform ausgeschüttelt und bei 25.000 g (+4°C) für 10 min zentrifugiert. Danach erfolgte eine abermalige Einengung der wässrigen Phase mit einem Rotationsverdampfer auf eine ca. 30%ige Lösung (bezogen auf Trockensubstanz) und anschließende Sterilfiltration.

2.22. Molekularsiebtrennung

1,8 ml des angereinigten Maisextraktes wurde an einer Sephadex G-10-Säule (Füllhöhe 500 mm) getrennt. Als Elutionsmittel wurde bidestilliertes, entgastes Wasser verwendet. Es wurden Fraktionen zu 10 ml gesammelt. Die Absorbtion des Eluates wurde bei 254 nm registriert.

2.23. Ionenaustauschchromatographie

Für die weitere Trennung wurde der Kationenaustauscher eingesetzt. Die aktiven Fraktionen der Sephadex-Trennung wurden vereinigt, auf etwa 2 ml am Rotationsverdampfer eingeengt und mit 500 ml Wasser am Kationenaustauscher chromatographiert. Danach erfolgte eine Elution mit einem linearen HCl-Gradienten (0-4 M, Gesamtmenge 500 ml). Es wurden Fraktionen zu 10 ml gesammelt.
Die weitere Trennung wurde am Anionenaustauscher vorgenommen. Die biologisch aktiven Fraktionen der Kationenaustauscher Chromatographie wurden vereinigt, am Rotationsverdampfer einge

dampft, mit Wasser aufgenommen und nochmals eingedampft. Der Rückstand wurde in 2 ml Wasser aufgenommen und am Anionenaustauscher mit 500 ml Wasser gespült. Anschließend wurde mit einem Ameisensäuregradienten (0-8 M) eluiert (Gesamtmenge 500 ml). Es wurden Fraktionen zu 10 ml gesammelt.

2.24. Radioaktive Markierung

Die Anzucht des Mycels erfolgte auf Cellophan (vgl. Material und Methoden 2.7.). Die Membranen wurden nach 3 d vom Nährboden abgezogen, auf eine Schablone gelegt und unter sterilen Bedingungen Cellophanplättchen mit einem 20 mm-Locheisen ausgestanzt. Die Mitte der ausgestanzten Plättchen wies einen Abstand von 25 mm zum Impfpunkt auf. Pro Petrischale konnten so 7 Plättchen gewonnen werden, je 5 dieser Membranen wurden in ein Szintillationsfläschchen gegeben, das 10 ml steriles, flüssiges Medium enthielt. Pro Fläschchen wurden unter sterilen Bedingungen 0,25 µCi L-U^{14}C-Arginin pipettiert. Die Inkubationsgefäße wurden bei 27°C im Wasserbad eines Reziprokschüttlers bei 200 Umdrehungen pro min geschüttelt. Nach 5 min wurden die Membranen mit einer Pinzette entnommen, in eine Glasfritte (D3) gelegt, 25 ml Fructose-Medium II eingefüllt und abgesaugt. Insgesamt wurde 5x mit Fructose-Medium II (L-U^{12}C-Arginin) gespült. Danach wurde das Mycel von der Membran abgekratzt, mit Filterpapier getrocknet, auf Messingplanchetten überführt und 16 h bei 80°C getrocknet. Nach einstündiger Abkühlung im Exsikkator wurde das Mycel auf Probenträger mit einer Auskleidung aus Kohlepapier überführt und bis zur Gewichtskonstanz gewogen. Mit Probenträgerhaltern wurden die Probenträger in Szintillationsgefäße gehängt, in die 0,5 ml ß-Phenethylamin pipettiert worden war. Die Gefäße wurden nur locker verschlossen in einen Exsikkator gestellt. Nach zweimaliger Evakuierung und Spülung mit Sauerstoff wurden die Gefäße fest verschlossen und die Proben im Micro-Mat (Vertriebs GmbH für Meßtechnik, Karlsruhe) verbrannt. Unge-

fähr 20 min nach der Verbrennung war das entstandene CO_2 absorbiert, daher konnten die Probenträger und Halter entfernt werden. Danach wurden pro Gefäß 10 ml TM Szintillator zugesetzt und im Tricarb Liquid Szintillations-Spectrometer 2425 (Packard) die Radioaktivität bestimmt.

TM Szintillator:

850 ml Toluol
150 ml Methanol
4,0 g PPO 2,5-Diphenyloxazol
0,1 g POPOP 1,4-bis-2-(5-Phenyloxazolyl)-Benzen

2.25. Kinematographie

Für die kinematographischen Untersuchungen wurde als Kamerasystem die Super 8 Kamera "Leicina Special" verwendet. Die makroskopischen Aufnahmen wurden mit dem Vario-Objektiv "Optivaron" 1:1,8/6-66 mm (Leitz) durchgeführt, während die mikroskopischen Untersuchungen am Photomikroskop II (Zeiss), über das Okular "Periplan" 6,3x (Leitz) und ein 1:10 verkleinertes Zwischensystem (Leitz) erfolgten. Nachdem sich die am Markt erhältlichen Steuergeräte für Zeitrafferstudien von empfindlichen biologischen Objekten als ungeeignet erwiesen, wurde ein Steuergerät für die Filmkamera und die Beleuchtungseinrichtungen entwickelt. Um exakte Aussagen über die zeitliche Koordination und die Geschwindigkeit der Bewegungsabläufe zu erhalten, mußte das Steuergerät folgenden Anforderungen entsprechen:

1. Drei unabhängig programmierbare Zeitglieder, welche die Steuerung von "Intervallzeit", Beleuchtung und Kameraauslösung vornehmen.
2. Exakte und reproduzierbare Einstellung dieser Zeitglieder.
3. Bei Fluoreszenzaufnahmen Steuerung einer Lichtklappe am Mikroskop.
4. Kontinuierliche Spannungserhöhung bis zur vollen Spannung für Halogenlampen.

5. Steuerung der Belichtungsautomatik und des Motorzooms der Leicinamatic.

2.25.1. Programmablauf des Steuergerätes

Das Programm begann mit dem Start des 1. Zeitgliedes. Nach Erreichen der vorprogrammierten Zeit wurde das 2. Zeitglied gestartet. War die vorgegebene Zeit erreicht, so lief das 3. Zeitglied an. Das Ende des 3. Zeitgliedes startete wiederum das 1. Zeitglied.
Als Zeitbasis wurden Zehntelsekunden verwendet, die ein Impulsgeber lieferte. Wurde das Steuergerät gestartet, so liefen die Impulse in einen Zeitvergleicher. War die vorgegebene Impulszahl (= vorprogrammierte Zeit des 1. Zeitgliedes) erreicht, wurde der Zeitvergleicher automatisch auf Null gesetzt. Derselbe Vorgang lief anschließend mit der 2. und 3. Uhr ab. Der Einstellbereich des 1. Zeitgliedes konnte zwischen 0,1 Sekunden und 99 min variiert werden, der des 2. Zeitgliedes zwischen 1 und 99 Sekunden und der des 3. Zeitgliedes zwischen 0,1 und 99 Sekunden.

2.25.2. Funktion der Zeitglieder

Das 1. Zeitglied begrenzte die "Intervallzeit", in der die Kamera und Beleuchtung ausgeschaltet waren. Das 2. Zeitglied schaltete vor der Kameraauslösung die Beleuchtungseinrichtungen ein (z.B. Entfernung der Blende aus dem Strahlengang, Regelung der Lampen auf volle Spannung, Formieren des Blitzlichtkondensators), damit die Lampen vor der Aufnahme ihre volle Spannung erreicht hatten. Das 3. Zeitglied steuerte die Auslösung der Kamera. Dabei konnte entweder eine Einzelaufnahme, eine Szene oder eine Langzeitbelichtung vorgenommen werden.
Mit dem Abschalten des 3. Zeitgliedes wurden auch die von dem 2. Zeitglied gesteuerten Funktionen in ihre Ausgangsposition zurückgeführt.

Die Anzahl der ausgelösten Bilder oder Szenen wurde digital angezeigt, ebenso die Zeit des jeweils laufenden Zeitgliedes. Leuchtdioden zeigten den Funktionsstand der Beleuchtung und die Spannungsversorgung der Kamera an. Wahlschalter ermöglichten eine außerprogrammäßige Zuschaltung der Beleuchtung sowie 2 Alternativen, die Kamera mit Spannung zu versorgen. Entweder konnte die Kamera nur durch das 3. Zeitglied mit Spannung versorgt werden oder aber die Kamera stand permanent unter Spannung. Um bei Lichtprogrammierungen auch die Belichtungsautomatik ohne Umbau der "Leicinamatic" benutzen zu können, wurde die Kamera nur während der Zeit des 3. Zeitgliedes mit Spannung versorgt. Durch diese Schaltung wurde verhindert, daß die Belichtungsautomatik auf den Wechsel der Lichtstärke, der durch das Ein- und Ausschalten der Beleuchtung hervorgerufen wurde, unnötig reagierte.
Eine Gebläsekühlung verhinderte thermische Ueberlastungen. Die Anzahl der gewünschten Aufnahmen konnte vorgegeben werden; war diese Anzahl erreicht, so schaltete sich das Steuergerät automatisch ab.

2.25.3 Klimabox

Für die Durchführung langfristiger Beobachtungen von mikroskopischen Präparaten war eine Temperaturkonstanz von 0,1°C notwendig, um eine Veränderung der Scharfeinstellung zu vermeiden und unter konstanten Bedingungen arbeiten zu können.

Hierzu wurde ein Teil des Photomikroskopes II von einem dreiteiligen Plexiglasgehäuse umgeben. Als Temperaturfühler wurde ein NTC-Widerstand benutzt, der einen Transistor ansteuerte. Der Transistor steuerte über einen Schmidt-Trigger ein Relais, das den Heizkörper (eine 40 Watt Glühlampe) ein- und ausschaltete. Die Luftumwälzung in der Klimabox erfolgte mit einem Lüfter (Fa. Papst, Typ 8550).

3. ERGEBNISSE

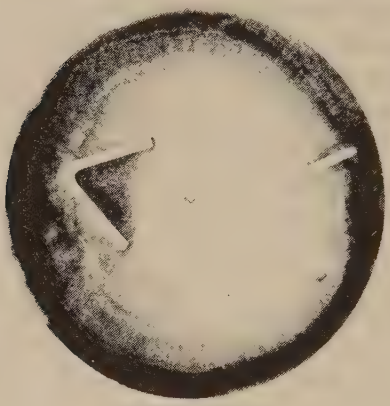
3.1. Morphologische Aspekte der Fruchtkörperbildung

a) Anstoßeffekt

Bei der Kultivierung von Sordaria macrospora K^{+}d auf Mais-Medium trat die Perithezienbildung immer zuerst am Rand der Petrischale auf, wobei die Höhe des Nährbodens keinen Einfluß auf dieses Phänomen hatte. Aehnliche Effekte wurden auch bei anderen Ascomyceten beschrieben (Turian 1966, Inoue und Furuya 1970, Pollock 1973). Um diesen Anstoßeffekt genauer zu untersuchen, wurden der sich ausbreitenden Kolonie Hindernisse in Form von Glasstäben in den Weg gelegt. Dabei zeigte sich, daß die Hindernisse mindestens 2 cm vom Impfpunkt entfernt sein und über eine Mindestlänge von 2 cm verfügen mußten, um eine verfrühte Perithezienbildung herbeizuführen. Wurden Glasdreiecke als Hindernisse verwendet, so traten unterschiedliche Effekte auf: Waren die Schenkel zum Impfpunkt geöffnet, so zeigte sich eine verfrühte und pro Flächeneinheit gesteigerte Perithezienbildung. Lag das Dreieck mit geschlossenen Schenkeln zum Impfpunkt, so war keine Fruchtkörperbildung zu beobachten (Abb. 4). Einen weiteren Hinweis dafür, daß das Anstoßen der Hyphen an ein Hindernis die Fruchtkörperbildung maßgeblich beeinflußt, lieferte der folgende Versuch: In eine Glasschale (Durchmesser 22 cm) wurde eine kleinere Glasschale (Durchmesser 3 cm) gesetzt, beide Schalen in gleicher Höhe mit Mais-Medium gefüllt und in der Mitte beimpft. Nach 4 d waren in der kleineren Schale schon unreife Perithezien zu erkennen. Das Mycel hatte den ca. 3 cm hohen Rand der kleineren Schale überwunden und war auf dem äußeren Nährboden weitergewachsen, hatte aber noch keine Perithezien gebildet (Abb. 5).
Wie diese Ergebnisse zeigen, wird nur dann eine Perithezienbildung stimuliert, wenn durch die Form der Hindernisse (Petrischalenrand bzw. Dreieck mit offenen Schenkeln zum Impfpunkt) eine Erhöhung der Myceldichte erzielt wird.

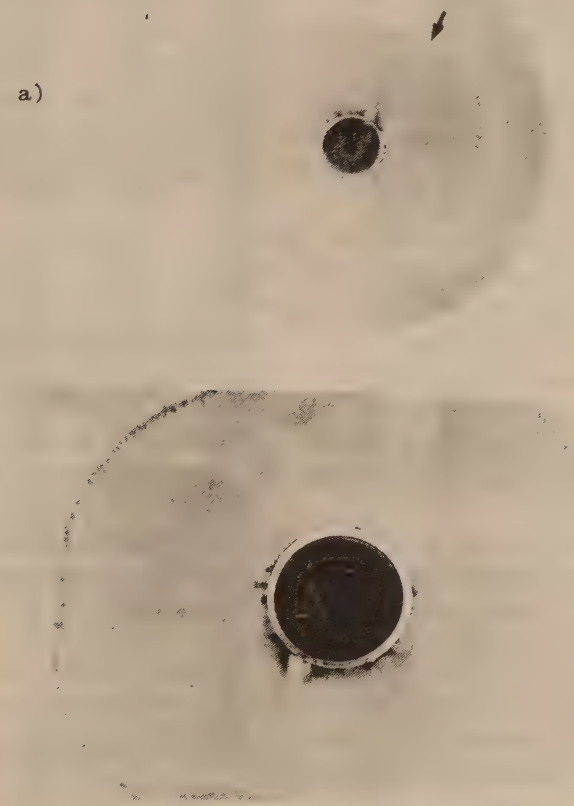
Abb. 4: Einfluß von Hindernissen auf die Perithezienbildung von Sordaria macrospora.
a) Schale (22 cm Durchmesser) in der Mitte beimpft. Dreieck als Hindernis. Perithezienbildung im linken Dreieck (zum Impfpunkt geöffnet).
b) Vergrößerung von a)

a)



b)

Abb. 5: Einfluß von Hindernissen auf die Perithezienbildung von Sordaria macrospora.
Versuchsanordnung: Große Glasschale mit kleiner Glasschale; beide Schalen gleich hoch mit Nähr-Medium gefüllt, kleine Glasschale in der Mitte beimpft. Auftreten der Perithezien nach 5 d Inkubation nur in der kleinen Schale; die große Schale zeigt nur Mycel, der Kolonierand ist als Zone von Luftmycel sichtbar (Pfeil). Die Kontrolle (nur die große Glasschale) zeigte auch nach 5 d Inkubaktion keine Perithezien.
a) Große Schale
b) Vergrößerung von a), keine Perithezienbildung außerhalb der kleinen Glasschale.



b) Protoperithezienbildung

Nachdem bisher für Sordaria macrospora unterschiedliche Aussagen über die Bildung von Protoperithezien vorlagen (Dangèard 1903, Dengler 1937, Lausberg 1957, Esser und Straub 1958), wurde die Bildung von Protoperithezien mit Hilfe kinematographischer Aufnahmen verfolgt.
Ausschnitte einer Zeitrafferstudie von der Bildung eines Protoperitheziums werden in Abb. 6 dargestellt. Die Ausschnitte wiesen einen Abstand von jeweils 75 min auf, während die einzelnen Bilder im Intervall von 10 Sekunden aufgenommen wurden. Aus der Reihe der Ausschnitte ist daher sehr gut zu erkennen, daß die Wachstumsgeschwindigkeit der Hüllhyphen beträchtlich zugenommen, während das Ascogon praktisch seine Endgröße erreicht hatte. Da ein verhältnismäßig großer Abstand der beiden Hüllhyphen zum Ascogon bestand, war das gerichtete Wachstum der beiden Hüllhyphen auf das Ascogon bemerkenswert, das auf eine chemotaktische Anlockung schließen ließ. Eine Anastomosenbildung zwischen Hüllhyphen und Ascogon war nicht zu beobachten. Im Normalfall ist jedoch die Bildung von Anastomosen nicht zu übersehen, da ein sehr auffälliger Wechsel von Richtung und Geschwindigkeit der Plasmaströmung während der Verschmelzung zweier Hyphen auftritt. Außerdem konnte bis zur vollständigen Umhüllung keine Einwanderung von Kernen in das Ascogon festgestellt werden, wobei jedoch das Ascogon trotz Bildung einiger Septen nicht von der Traghyphe abgeschlossen war.
Eine Klärung der Frage nach der Kernwanderung und dem Zeitpunkt der Meiose erscheint unter diesen Umständen nur mit mikrotomischen Untersuchungsmethoden sinnvoll.

Die Zeitrafferstudien der Protoperithezienbildung zeigten auch daß häufig 2 Ascogone in unmittelbarer Nachbarschaft ausgebildet werden. Erfolgt eine Weiterentwicklung der beiden Organe, indem sie sich spiralisieren und Hüllhyphen ausgebildet werden, so sorgen noch unbekannte Mechanismen dafür, daß nur 1 Ascogon umhüllt wird, während das andere Ascogon

zu einer vegetativen Hyphe auswächst. Diese Redifferenzierung des Ascogons ist auch an den bereits gebildeten Hüllhyphen zu erkennen, die plötzlich ihr gerichtetes Wachstum auf das Ascogon beenden und ein ungerichtetes Wachstum weiterführen (vgl. Abb. 7).

Abb. 6: Ascogon- und Hüllhyphenbildung. Ausschnitte einer Zeitrafferreihe, aufgenommen am Photomikroskop II (Interferenzkontrast, Objektiv Plan 40x) in der Agar-Kammer. Alle 10 Sekunden wurde eine Einzelbildschaltung vorgenommen. Der Abstand der einzelnen Ausschnitte betrug 75 min. Die Pfeile weisen auf die Hüllhyphen, die auf das Ascogon (A) zuwachsen.

Abb. 7: Protoperithezienbildung. Ausschnitte einer Zeitrafferreihe, aufgenommen am Photomikroskop II (Interferenzkontrast, Objektiv Plan 40x) in der Agar-Kammer. Alle 15 Sekunden erfolgte eine Einzelbildschaltung. Der Abstand der einzelnen Ausschnitte betrug 90 min.
A = Ascogon, das sich zu einem Protoperithezium entwickelt.
weißer Pfeil = Ascogon, das sich nicht zu einem Protoperithezium entwickelt.
schwarzer Pfeil = Hüllhyphen

Aehnliche Verhältnisse treten bei der Weiterentwicklung von Protoperithezien auf. Auch hier sind Mindestabstände zwischen den bereits gebildeten Protoperithezien notwendig, damit eine Weiterentwicklung zu Perithezien erfolgen kann.

3.2. Einfluß von Licht, Temperatur, pH-Wert und Nährstoffangebot auf die Fruchtkörperbildung

Diese Experimente wurden ausschließlich auf Mais-Medium durchgeführt, wobei pro Ansatz 5 Parallelproben erstellt wurden.

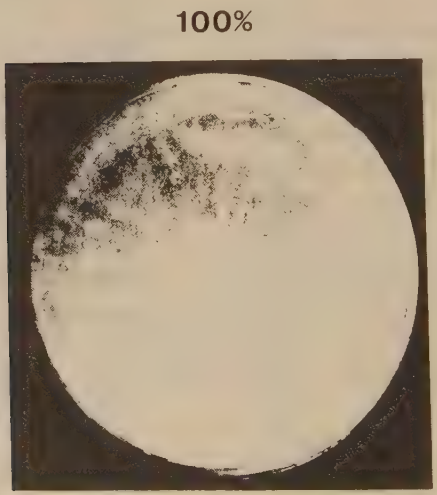
a) Licht.
Die Beimpfung der Testplatten erfolgte sowohl mit Mycelstücken als auch mit Sporen. Dabei wurden Kulturen über 4 Generationen hinweg entweder nur im Dunkeln oder im Licht beimpft und inkubiert. Es konnte jedoch in keinem Fall eine sichtbare Beeinflussung der Bildung von Fruchtkörpern durch das Licht festgestellt werden.

b) Temperatur:
Die Kulturen wurden bei 10°, 20°, 27° und 35°C inkubiert. Von diesen Ansätzen zeigten die bei 27°C kultivierten Platten die rascheste Fruchtkörperbildung: Schon nach 7 d wiesen diese Kulturen die meisten Perithezien auf. Im Vergleich dazu zeigten die bei 10° und 20°C inkubierten schwächeres und langsameres Wachstum. Die bei 35°C bebrüteten Kulturen hingegen fielen durch ein starkes und schnelles vegetatives Wachstum auf, allerdings waren hier auch nach 28 d noch keine Fruchtkörper ausgebildet. Der Entwicklungszyklus war auf der Stufe der Protoperithezien durch die erhöhte Temperatur blockiert. Diese Befunde stehen mit den Ergebnissen von Westergaard und Mitchell (1947), Hirsch (1954) sowie Viswanath-Reddy und Turian (1975) an *Neurospora* spec. in Einklang.

c) pH-Wert:
Zur Feststellung, inwieweit der pH-Wert des Nähr-Mediums die Perithezienbildung beeinflussen kann, wurde die Protonenkonzentration des Mais-Mediums zwischen pH 5,0 und 8,0 variiert. Die Medien ließen keinen Unterschied hinsichtlich Wachstum und Fruchtkörperbildung erkennen. Für sämtliche weiteren Experimente wurde der pH des Mediums auf 6,0 eingestellt.

d) Nährstoffangebot:
Nach Klebs (1900) wird die sexuelle Reproduktion bei niederen Organismen häufig durch Nährstofflimitierung induziert. Zur Ueberprüfung dieser Hypothese wurden Nährbodengradienten in der Mitte beimpft und bei 27°C inkubiert (vgl. Abschnitt 2.9.). Aus der Abb. 8 geht hervor, daß die Bildung der meisten Perithezien im Bereich des größten Nährstoffangebots erfolgt.

Abb. 8: Einfluß eines Nährbodengradienten auf die Perithezienbildung von Sordaria macrospora K^+d (nach 11 d). Die Beimpfung erfolgte in der Mitte.

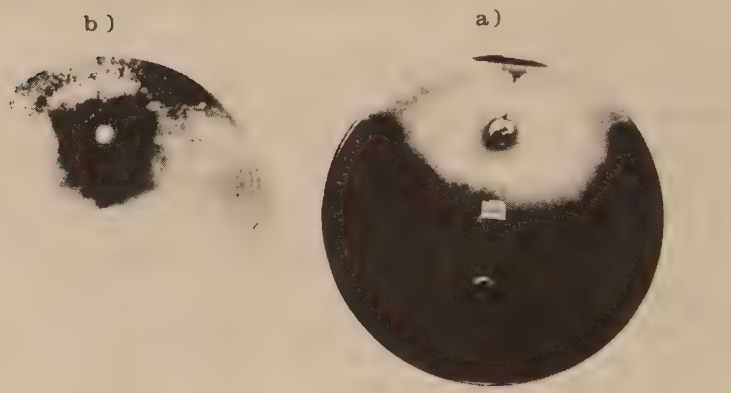


Diese Ergebnisse zeigten, daß die Fruchtkörperbildung von Sordaria macrospora K^{+}d über weite pH-Bereiche konstant ist, von Licht nicht beeinflußt wird, durch Temperaturen über 35°C jedoch blockiert werden kann. Außerdem steht die Perithezienbildung und -dichte in einem proportionalen Verhältnis zum Nährstoffangebot. Eine genauere Analyse des Zusammenhangs zwischen Fruchtkörperbildung und Nährstoffangebot erfolgt im nächsten Abschnitt.

3.4. Induktion der Fruchtkörperbildung durch das Nährstoffangebot

Auf Mais-Medium bildete der Pilz nach 7 d reife Perithezien aus. Wurde allerdings Stärke-Medium (Minimalmedium) als Nährsubstrat verwendet, so war zwar ein vegetatives Wachstum möglich, es wurden jedoch nur kleine Protoperithezien gebildet, die sich selbst nach 30 d nicht weiterentwickelt hatten. Wurde jedoch dem Stärke-Medium Maiswasser (vgl. Material und Methoden 2.3.1.) zugesetzt, so konnte dadurch eine Perithezienbildung induziert werden.
Somit mußten im Mais-Medium ein oder mehrere Faktoren vorhanden sein, welche(r) die Bildung von Perithezien induzierte(n). Abb 9 b zeigt die Induktion der Fruchtkörper nach 7 d, wenn im Lochtest auf Stärke-Medium 50 µl Maisextrakt (15 µg Trockensubstanz) zugesetzt werden.

Abb. 9: Induktion der Perithezienbildung auf Stärke-Medium durch Zusatz von Maisextrakt. In das obere Loch wurde Maisextrakt, in das untere Wasser eingefüllt.
a) 24 h nach der Zugabe (= 72 h nach der Beimpfung). Die Platte wurde unter indirekter Beleuchtung fotografiert, um die Zunahme der Myceldichte sichtbar zu machen.
b) 96 h nach der Maisextraktzugabe (= 144 h nach der Beimpfung). Fruchtkörperbildung im Bereich der Zugabestelle nach 6 d.



Aus der Abb. 9 a geht hervor, daß die Zugabe von Maisextrakt schon nach 24 h eine erhebliche Verdichtung des Mycels bewirkt. 96 h nach der Zugabe (Abb. 9 b) waren schließlich Perithezien, dem Konzentrationsgradienten folgend, um die Zugabestelle verteilt. In allen bisher beobachteten Fällen ging der Perithezienbildung eine sprunghafte Zunahme der Mycelverzweigungen voraus, so daß ein funktioneller Zusammenhang zwischen diesen beiden Phänomenen vermutet werden mußte. Durch weitere Experimente konnte nachgewiesen werden, daß das Alter des Mycels für die Induktion ohne Belang war: Die Kompetenz des Mycels erstreckte sich über einen Zeitraum von mindestens 21 d.

Aus diesen Befunden konnte gefolgert werden, daß sich im Maisextrakt Stoffe befinden mußten, welche für die Bildung von Perithezien erforderlich sind. Nachdem es nicht auszuschließen war, daß ein allgemeiner Nährstoffmangel eine Limitierung der Fruchtkörperbildung auf Stärke-Medium hervorgerufen hatte, wurde mit Hilfe der Faktorenanalyse eine Optimierung des Testmediums vorgenommen.

3.4. Optimierung des Test-Mediums

Zunächst wurden verschiedene synthetische Nähr-Medien untersucht, die aufgrund von Literaturangaben [Lindenmayer und Schoen (1967), Elliot (1969), Hall (1971), Westergaard und Mitchell (1947) und Moore-Landecker und Stotzky (1973)] für Ascomyceten in Frage kamen. Die Resultate zeigten, daß lediglich das sogenannte "Saccharose-Nitrat-Medium" von Lindenmayer und Schoen (1967) brauchbar war. Auf diesem Medium erfolgte die Bildung von Perithezien, die jedoch erst nach 10 - 14 d die Sporen ausschleudern konnten. Auf den anderen Medien trat teilweise keine Fruchtkörperbildung (nach 14 d) oder eine wesentlich geringere als auf dem "Saccharose-Nitrat-Medium" auf (vgl. 3.6.). Daher wurde dieses Medium als Grundlage für weitere Optimierungsexperimente verwendet, wobei die Saccharose durch Stärke ersetzt wurde, da sich diese Kohlenhydratquelle für die Fruktifikation unter diesen Bedingungen als vorteilhaft erwiesen hatte.

In Vorversuchen konnten als Hauptkomponenten Stärke, Biotin, KNO_3 und KH_2PO_4 ermittelt werden. Für die Bildung von reifen Perithezien innerhalb von 7 d war jedoch der Zusatz von Maisextrakt prinzipiell notwendig. Ohne diesen Zusatz kam es nur zur Bildung von Protoperithezien.
Mit Hilfe der Faktorenanalyse (Linder 1969) wurden Stärke, KNO_3 , KH_2O_4 und Biotin optimiert. Eine weitere Verbesserung des Nähr-Mediums konnte durch den Zusatz von $MgSO_4$ und $ZnSO_4$ erzielt werden, während die restlichen Komponenten des Mediums von Lindenmayer und Schoen (1967) sich als unwirksam

erwiesen. Die meisten Perithezien pro Platte wurden bei folgender Zusammensetzung gefunden:

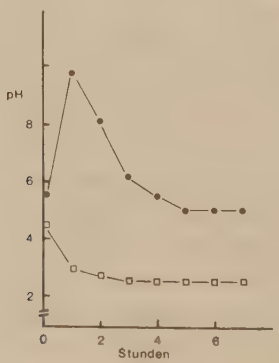
15,0 g	Stärke	
3,0 g	KNO_3	(29,67 mM)
1,0 g	KH_2PO_4	(7,35 mM)
0,5 g	$MgSO_4$	(2,02 mM)
0,2 mg	$ZnSO_4$	(0,69 nM)
12,5 µg	Biotin	(51,14 nM) ad 1 l.

Die Auszählung der Perithezien erfolgte an 8 äquidistanten Stellen (Durchmesser 6 mm) der Petrischale unter dem Stereomikroskop.

3.5. Reinigung des Maisextraktes

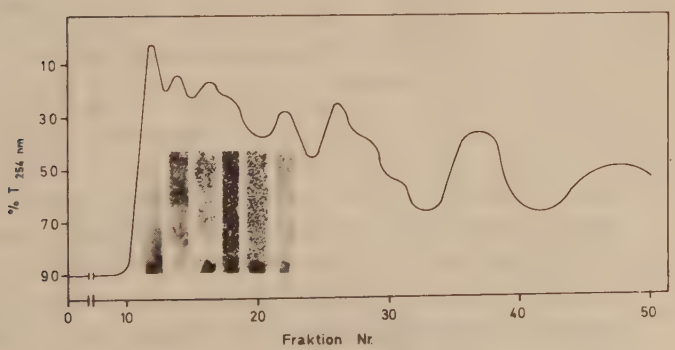
Um die Fruchtkörper induzierende(n) Komponente(n) zu identifizieren, wurde eine Reinigung des Maisextraktes durchgeführt. Nach der Extraktion (1) und der Einengung (2) wurde der Extrakt einer Elektrodialyse (3) unterworfen.
Abb. 10 zeigt den zeitlichen Verlauf des pH-Werts in beiden Elektrodenräumen. Nach 5 h erfolgte keine Aenderung des pH-Werts mehr.

Abb. 10: Verlauf des pH-Werts während der Elektrodialyse.
●-●-● Kathodenraum, □-□-□ Anodenraum.



Die gesamte biologische Aktivität befand sich nach 7 h Elektrodialyse außerhalb des Dialyseschlauches (= Anodenraum). Daraus ging hervor, daß das Molekulargewicht relativ klein und die Substanz(en) positiv geladen sein mußte(n).
Nach einer weiteren Einengung wurde mit Chloroform (4) ausgeschüttelt, um Pigmente zu entfernen. Dabei erfolgte die Abtrennung eines weißen, flockigen Niederschlags ohne biologische Aktivität. Im Anschluß daran wurde eine Gelfiltration (5) an Sephadex G-10 durchgeführt. Abb. 11 zeigt das Chromatogramm der Trennung. Eine exakte Molekulargewichtsbestimmung war in diesem Stadium der Reinigung noch nicht möglich. In jedem Falle mußte das Molekulargewicht unter 700 liegen (= Ausschlußgrenze von Sephadex G-10).

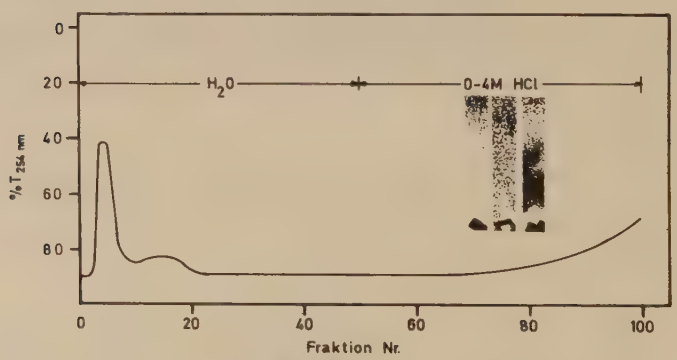
Abb. 11: Gelfiltration des angereinigten Maisextraktes an Sephadex G-10. Säulendimensionen: 30x500 mm. Elutionsgeschwindigkeit: 1 Tropfen pro 3 Sekunden. Transmission bei 254 nm.
Die eingefügten Fotos zeigen die biologische Aktivität der Fraktionen 12, 14, 16, 18, 20 und 22.



Nach Einengung der aktiven Fraktionen wurde aufgrund der positiven Ladung eine Chromatographie an einem Kationenaustauscher vorgenommen. Abb. 12 zeigt das Chromatogramm an Dowex 50W. Die Elution erfolgte mit je 500 ml Wasser (pH 5,8) und einem linearen HCl-Gradienten (0-4 M). Die überschüssige Salzsäure wurde durch mehrmaliges Abdampfen entfernt. Der anschließende Plattentest zeigte, daß ein scharfer Gipfel der biologischen Aktivität im HCl-Gradienten zwischen 2,0 und 2,5 M HCl lag. Damit war die Bestätigung der positiven Ladung erbracht.

Abb. 12: Kationenaustauscher-Chromatographie (Dowex 50W) der biologisch aktiven Fraktionen nach der Gelfiltration (vgl. Abb.11, Fraktionen 16-20).

Säulendimensionen: 30x180 mm, Elutionsgeschwindigkeit: ca. 1 Tropfen pro Sekunde, Transmission bei 254 nm. - Aus den beigefügten Fotos ist die biologische Aktivität der Fraktionen 70, 75 und 80 zu erkennen.



Eine Uebersicht über das Reinigungsverfahren zeigt Tab. 4. Wie der Tab. 4 zu entnehmen ist, erfolgte eine 55fache Anreicherung der biologischen Aktivität bei einer Ausbeute von 78%. Im Verlaufe der Reinigung wurden eine oder mehrere hemmende Substanzen entfernt, außerdem erfolgte eine Anreicherung der induzierenden Faktoren.

Tab. 4: Reinigung der biologisch aktiven Substanzen.
Perith. = Perithezienzahl, T.S. = Trockensubstanz
Pro Petrischale wurden jeweils 100 µl zugesetzt.
Die Auszählung erfolgte in jeweils 4 Petrischalen.

Reinigungsschritt	Gesamt-Volumen ml	Gesamt-Perithezienzahl	Perith./ml	mg T.S./ml	Perith./mg T.S.	Ausbeute %	Anreicherung
Extraktion	80	65000	812	3,6	226	100,0	1,00
Einengung	1	57640	57640	231,2	249	88,6	1,10
Elektrodialyse	1	79511	79511	189,4	420	122,3	1,85
Chloroform-Extraktion	1	82120	82120	176,8	464	126,3	2,05
Gelfiltration (Sephadex G-10)	1	84982	84982	33,0	2575	130,7	11,39
Kationenaustauscher-Chromatographie	1	50766	50766	4,0	12691	78,1	55,87

Die hier aufgeführten Reinigungsmethoden ließen folgende Eigenschaften der biologisch aktiven Substanz(en) erkennen:

1. Stabilität gegen Hitze (Autoklavieren) und Säure (konz. HCl),
2. Wasserlöslichkeit (Chloroform-Extraktion),
3. Molekulargewicht unter 700 (Verhalten an Sephadex G-10),
4. positive Ladung (Verhalten bei der Elektrodialyse und am Kationenaustauscher).

Zur Abtrennung von amphoteren Substanzen wurde im Anschluß eine Chromatographie an einem Anionenaustauscher (Dowex 1x2) mit einem Ameisensäure-Gradienten durchgeführt.
Im Vorlauf dieser Chromatographie konnte keine biologische Aktivität nachgewiesen werden, die Testplatten zeigten vielmehr zum Teil sehr starke Wachstumshemmungen. Dagegen wurde durch alle Fraktionen des Ameisensäure-Gradienten eine geringe Bildung von unreifen Perithezien hervorgerufen. Außerdem war im gesamten Eluat des Anionenaustauschers keine U.V.-Absorption mehr festzustellen. Die einfachste Erklärung war, daß durch diesen Reinigungsschritt eine irreversible Trennung oder Zerstörung von Substanzen erfolgt war.

Mit Hilfe der Dünnschicht-Chromatographie wurde gezeigt, daß sich in den getesteten Fraktionen des Anionenaustauschers vor allem Aminosäuren befanden.
Hierauf wurden 20 verschiedene Aminosäuren in 30 mM Lösung im Lochtest auf komplettiertem Stärke-Medium überprüft. Von sämtlichen getesteten Aminosäuren führte ausschließlich L-Arginin zu einer sehr starken Perithezienbildung. Die Fruchtkörper waren bereits nach 7 d reif (= Sporen ausgeschleudert).

Die Ergebnisse der Lochtests mit den verschiedenen Aminosäuren sind in Tab. 5 zusammengestellt. Daraus geht hervor, daß einige Aminosäuren eine hemmende Wirkung nicht nur auf die Fruchtkörperbildung, sondern auch auf das vegetative Wachstum ausübten. Diese Befunde bestätigten die Resultate der

Anionenaustauscher-Chromatographie: L-Arginin (pI = 10,76) und Histidin (pI = 7,58) wurden gemeinsam im Vorlauf (Elution bei pH 5,8) eluiert, dadurch wurde die L-Arginin-Wirkung aufgehoben. Die schwach wirksamen Aminosäuren (pI < 6,0) wurden dagegen erst durch den Ameisensäure-Gradienten eluiert.

Offensichtlich wurde beim letzten Schritt des Reinigungsverfahrens ein für die Fruchtkörperbildung ungünstiges Verhältnis von L-Arginin und L-Histidin hergestellt, so daß eine Hemmung der Fruktifikation hervorgerufen wurde.
Dabei muß allerdings eine wesentlich höhere Konzentration von L-Histidin im Verlauf der Anionenaustauscher-Elution vorgelegen haben, da durch die Zugabe von einer äquimolaren Mischung von L-Arginin und L-Histidin (30 mM) im Lochtest Fruchtkörperbildung induziert werden konnte.

Tab. 5: Wirkung der Aminosäuren im Lochtest auf komplettiertem Stärke-Medium, Zusatz: 100 µl 30 mM Lösung pro Testplatte.
Wurde durch Aminosäuren das Wachstum gehemmt, so trat auch keine Fruchtkörperbildung auf.

Perithezienbildung			Wachstum
stark	schwach	keine	Hemmung
L-Arginin	L-Asparaginsäure	L-Asparagin	L-Histidin
	L-Glycin	L-Prolin	L-Cystein
	DL-Methionin	L-Tryptophan	L-Lysin
	L-Phenylalanin	δ-Aminobuttersäure	L-Methionin
	Serin	L-Leucin	DL-Threonin
	L-Valin	L-Isoleucin	L-Threonin
	L-Tyrosin		
	L-Glutaminsäure		

3.6. Auswahl einer für die Perithezienbildung günstigen Kohlenhydrat-Quelle

Da Stärke keine einheitliche Substanz darstellt und keine befriedigenden Reinheitskriterien für dieses Substrat existieren, wurde versucht, eine definierte, für die Fruchtkörperbildung günstige Kohlenhydrat-Quelle zu finden. Aus den Ergebnissen von Hawker (1957), Bretzloff (1954) und Esser (1956 b) war bekannt, daß Saccharose bei vielen Pilzen die Fruchtkörperbildung, Glucose dagegen das Mycelwachstum und die vegetative Vermehrung fördert. Daher wurde Stärke in getrennten Ansätzen durch Glucose, Fructose, Mannose, Saccharose, Maltose oder Raffinose ersetzt. Die übrigen Komponenten entsprachen der Zusammensetzung des kompletttierten Stärke-Mediums, das durch 1,0 mM L-Arginin ergänzt worden war. Die Konzentration des Kohlenhydratanteils wurde in 9 Stufen zwischen 0,01 und 1,5% variiert. Die Ergebnisse zeigten, daß die Fruchtkörperbildung auf Fructose-Medium qualitativ und quantitativ die anderen getesteten Kohlenhydrate weit übertraf.

Aufgrund dieser Resultate war verständlich, warum die aus der Literatur bekannten, synthetischen Nähr-Medien (vgl. Abschnitt 3.4.) für die Fruchtkörperbildung von Sordaria macrospora nicht geeignet waren, da ja die meisten Medien Glucose oder Saccharose als C-Quelle enthielten. Die Tatsache, daß auf Fructose-Medium eine zahlenmäßig wesentlich gesteigerte Perithezienbildung erzielt werden konnte, und diese Substanz in hochreiner Form zu verwenden war, berechtigte dazu, für das synthetische Perithezien induzierende Medium ausschließlich Fructose als Kohlenhydrat-Quelle zu verwenden.

3.7. Kann die Wirkung von L-Arginin durch Maisextrakt erhöht werden?

Nachdem aus den bisherigen Ergebnissen nicht zu ersehen war, ob das im Maisextrakt enthaltene L-Arginin bei der Perithezien-Induktion als Hauptfaktor wirkte, wurde überprüft, inwieweit die Anzahl der Perithezien auf dem Fructose-Medium I (mit L-Arginin) durch den Zusatz von Maisextrakt erhöht werden konnte. Dabei erwies sich der Zusatz von Maisextrakt als völlig wirkungslos für die Perithezienbildung. Die bereits durch L-Arginin erzielte Optimierung übertraf um ein Mehrfaches die Fruchtkörperbildung auf natürlichem, nicht angereichertem Mais-Medium.

3.8. Optimierung des synthetischen Mediums

Als die zweifellos interessantesten Komponenten des synthetischen Mediums für die Fruchtkörperbildung erschienen L-Arginin, Biotin und Fructose. Um einen Ueberblick über die Wechselwirkungen dieser 3 Bestandteile des Mediums zu bekommen, wurde ein 3-Faktoren-Experiment mit 4 bzw. 5 (Biotin) Konzentrationen angesetzt. Die übrigen Komponenten wurden konstant gehalten, da schon den Optimierungs-Versuchen des Test-Mediums zu entnehmen war, daß für diese Bestandteile eine optimale Konzentration erreicht war (vgl. Tab. 6).

Da durch verschiedene Nährstoff-Kombinationen eine ungleichmäßige Verteilung der Perithezien auf dem Nähr-Medium hervorgerufen wurde, war es notwendig, die Fruchtkörperzahl mit Hilfe der manuellen Auszählung (vgl. Abschnitt 2.12.1.) zu bestimmen.
Die Auswertung erfolgte nach 7 d, da unter diesen experimentellen Bedingungen das Wachstum und die Entwicklung des Pilzes abgeschlossen waren.
In Abb. 13 wird ein Teil des 3-Faktoren-Experiments dargestellt.

Tab. 6: Versuchsansatz zur Optimierung von Fructose, L-Arginin und Biotin. Aus der Versuchsanordnung ergaben sich 80 verschiedene Kombinationen. Jede Kombination wurde in 2 Parallelansätzen erstellt.

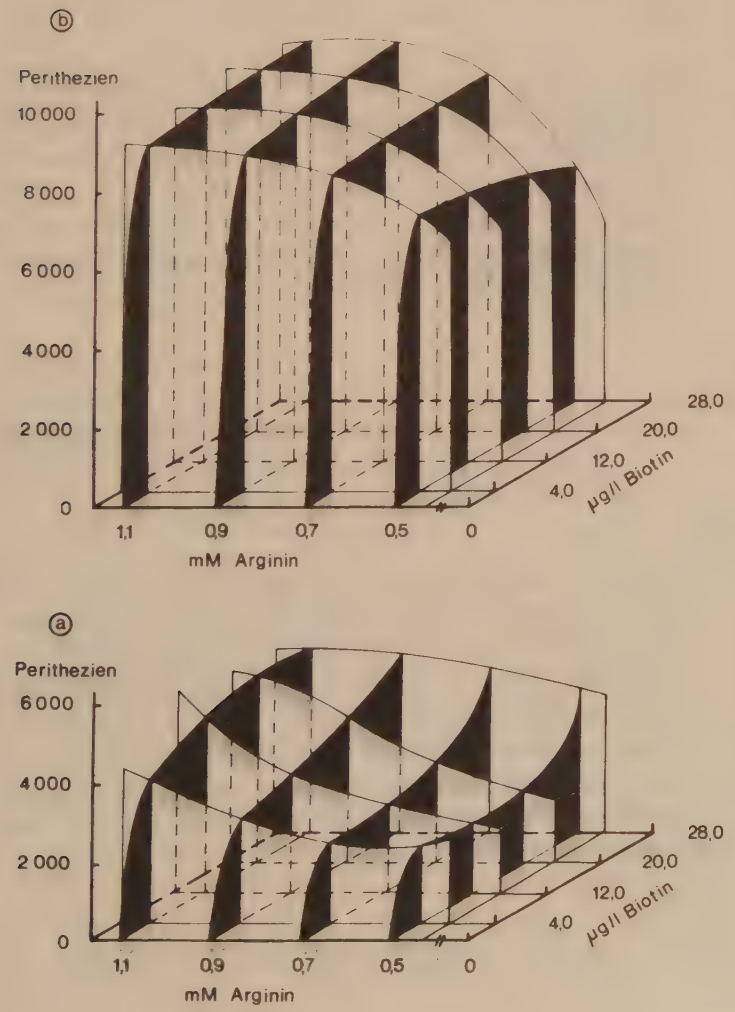
Fructose		27,7 mM	55,5 mM	83,2 mM	111,0 mM
L-Arginin		0,5 mM	0,7 mM	0,9 mM	1,1 mM
Biotin	0,0 µg/l	4,0 µg/l	12,0 µg/l	20,0 µg/l	28,0 µg/l
KNO_3		29,67 mM			
KH_2PO_4		7,35 mM			
$MgSO_4$		2,02 mM			
$ZnSO_4$		0,69 µM			

Die Abb. 13 zeigt, daß für die Bildung von Fruchtkörpern Biotin unbedingt notwendig ist. Wurde dem Medium kein Biotin zugesetzt, so erfolgte auch nach längerer Zeit (28 d) keine Fruchtkörperbildung, die Entwicklung war auf dem Stadium der Protoperithezien blockiert. Der Zeitpunkt der Fruktifikation war jedoch bei allen Kombinationen mit Biotin identisch (= 6 d). Durch eine Erhöhung der Biotin-Konzentration von 4,0 auf 28,0 µg/l konnte nur bei der suboptimalen Fructose-Konzentration (27,7 mM, Abb. 13 a) die Zahl der Perithezien gesteigert werden.

Wurde jedoch die Konzentration von L-Arginin (0,5 auf 1,1 mM) erhöht, so erfolgte in allen Kombinationen, die eine Fruktifikation erlaubten (mit Biotin), auch eine Erhöhung der Fruchtkörperbildung.

Die Erhöhung der Fructose-Konzentration von 27,7 mM (Abb. 13 a) auf 83,2 mM (Abb. 13 b) bewirkte ebenso eine drastische Steigerung der Perithezienzahl (bis zu einer Verdoppelung).

Abb. 13: Der Einfluß von L-Arginin, Biotin und Fructose auf die Zahl der Perithezien pro Platte nach 7 d.
a) 27,7 mM Fructose
b) 83,2 mM Fructose
Manuelle Auszählung der Perithezien von jeweils einer Test-Platte.



Aus Abb. 13 geht auch hervor, daß zwischen den 3 Faktoren L-Arginin, Biotin und Fructose Wechselwirkungen herrschen, da der Verlauf der Kurven (Abb. 13 a) sowohl eine "numerisch additive" als auch eine "numerisch multiplikative" Verrechnung (Mohr und Sitte 1971) ausschließt.

Da in diesem Experiment nur eine Sättigung der Perithezienbildung erreicht worden war, wurde von Molowitz (1975) in 2 Faktoren-Experimenten eine weitere Optimierung des Mediums vorgenommen. Die dabei gefundenen Ergebnisse (vgl. Fructose-Medium II) wiesen nur geringe Abweichungen im Vergleich zur Zusammensetzung von Fructose-Medium I auf.

3.9. Vergleich der Fruchtkörperbildung auf dem sythetischen Medium mit Stärke bzw. Fructose als Kohlenhydrat-Quelle

Aus den bisherigen Ergebnissen war zu vermuten, daß durch Stärke und Fructose die Fruchtkörperbildung in unterschiedlicher Weise beeinflußt wird. Daher wurde ein quantitativer Vergleich der Perithezienbildung auf dem synthetischen Medium (Fructose-Medium II) mit Fructose bzw. Stärke als Kohlenhydrat-Quelle (beide 12 ,0 g/l) durchgeführt. Dabei zeigte es sich, daß durch Stärke die Zahl der Fruchtkörper auf 73,7% gesenkt wird (vgl. Tab. 7).

Tab. 7: Einfluß von Stärke und Fructose auf die Perithezien-dichte. Die übrigen Komponenten entsprachen dem Fructose-Medium II. Mittelwert und Standardabweichung der Perithezien pro Platte.

Fructose	$\bar{x}$	3510	s	320
Stärke	$\bar{x}$	6867	s	410

3.10. Morphologische Aspekte der Faktorenanalysen

Die morphologischen Analysen ergaben weiterhin folgende wichtige Befunde über die Wirkungen der Komponenten des synthetischen Mediums:

1. Die Erhöhung der Fructose-Konzentration (83,2 mM auf 138,7 mM) induzierte die Bildung von anormal vergrößerten Perithezien mit verringerter Ascuszahl. Dieser Effekt konnte durch eine Steigerung der L-Arginin-Konzentration (0,5 auf 2,5 mM revertiert werden, nicht jedoch durch KNO_3. Die Konzentration der übrigen Komponenten hatte auf diesen Vorgang keinen Einfluß.
2. Stärke führte im Gegensatz zu Fructose zu einer beträchtlichen Pigmentbildung (braun-schwarz), die durch eine Erhöhung der Nitrat-Konzentration (> 25,0 mM) stark reduziert werden konnte.
3. Ueberhöhte Phosphat-Konzentrationen (> 100 mM) induzierten eine grüne Pigmentbildung.

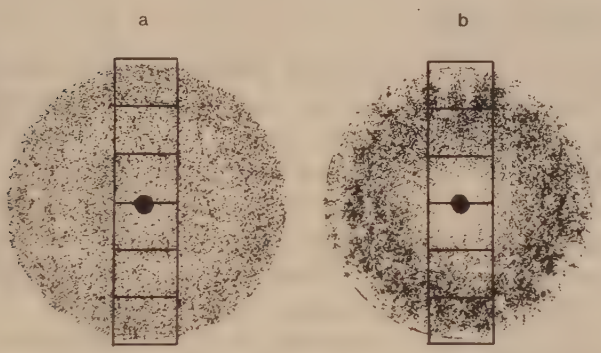
4. Von einer Mindest-Konzentration Biotin (12,3 µg/l) an erbrachte eine weitere Erhöhung über 3 Zehnerpotenzen keinen Einfluß auf die Zahl der gebildeten Perithezien.

5. Wurde Fructose anstelle von Stärke als Kohlenhydrat-Quelle verwendet, so fand auch ohne den Zusatz von L-Arginin nach 9-11 d eine verringerte Fruchtkörperbildung statt.

3.11. Modulation der Perithezienbildung durch L-Arginin auf Fructose-Medium

Um gleichzeitig die Zahl und Größe der Fruchtkörper und ihrer Vorstufen zu erfassen und somit die Entwicklung von Protoperithezien zu Perithezien in Abhängigkeit von der Zeit und L-Arginin zu verfolgen, wurde mit einem Bildanalysator (Omnicon Pattern Analysis System = PAS) eine quantitative Auswertung der Fruchtkörperbildung vorgenommen. Als Medien wurden Fructose-Medium II mit und ohne L-Arginin verwendet. Pro Ansatz wurden je 5 Testplatten beimpft und nach 4 d im Abstand von 24 h fotografiert (vgl. 2.12.1.). Die Auswertung der Negative erfolgte am PAS. Da sich auf der Oberfläche des Nährbodens die einzelnen Fruchtkörper berührten und überdeckten, wurden derartige Agglomerate vom PAS nur als 1 Teilchen gesehen, so daß die gemessene Anzahl der Teilchen nicht der Anzahl der Perithezien entsprach. Als Maß für die Zahl der Fruchtkörper kann jedoch die Gesamtfläche der als Objekt erkannten Teilchen herangezogen werden, wenn die Teilchen gleiche mittlere Flächen aufweisen. Sonst muß eine Flächenkorrektur vorgenommen werden. Abb. 14 zeigt je eine Testplatte der beiden Medien (Abb. 14 a ohne L-Arginin, Abb. 14 b mit L-Arginin). In die Platten wurden die 6 Meßfelder des Bildanalysators eingezeichnet, die zusammen ein Drittel der Petrischalenfläche erfassen.

Abb. 14: Verteilung der Fruchtkörper auf Fructose-Medium II nach 6 bzw. 9 d.
a) ohne L-Arginin = 9 d
b) mit L-Arginin = 6 d
Die 6 Meßfelder erfassen zusammen ein Drittel der gesamten Fläche einer Testplatte.



Ein Vergleich der Fruchtkörperbildung auf beiden Medien zeigt, daß die Perithezien auf dem Medium mit L-Arginin ungleichmäßig verteilt sind, woraus eine Unterbelegung der beiden zentralen Meßfelder des Bildanalysators resultiert. Der flächenmäßige Anteil der unterbelegten Felder beträgt etwa ein Drittel. Daher müssen die vom PAS gemessenen Werte (= Gesamtfläche aller Teilchen) bei einer ungleichmäßigen Verteilung entsprechend korrigiert werden: in diesem Fall um 30%, da sich auch in den beiden zentralen Meßfeldern einige Fruchtkörper befinden. Auf dem Medium ohne L-Arginin hingegen ist eine annähernd gleichmäßige Verteilung der Fruchtkörper über die ganze Platte realisiert. Durch Verwendung eines X-Y-Tisches am Mikroskop ist es jedoch möglich, die gesamte Fläche der Testplatte in Meßfelder aufzugliedern und zu messen. Damit kann selbst bei einer extrem ungleichmäßigen Verteilung der zu messenden Objekte eine exakte Bestimmung der Gesamtfläche aller Teilchen vorgenommen werden.

Die Verwendung eines Bildanalysators für derartige Auswertungen erscheint daher durchaus sinnvoll, da die Erstellung einer Größenverteilung nur mit einem solchen Gerät möglich ist und die Messungen in ca. 10% der Zeit einer manuellen Auszählung durchgeführt werden können.

a) Größenverteilung

Die Ergebnisse der Bildanalyse sind in Abb. 15 dargestellt. Auf dem Medium ohne L-Arginin waren nach 4 Inkubationstagen die gebildeten Strukturen zu klein, um mit dieser Fotografier- und Meßtechnik erfaßt werden zu können.
Auf dem Medium mit L-Arginin hingegen wurden nach dieser Zeit vom PAS bereits Objekte erkannt. Mikroskopische Untersuchungen der Testplatten zeigten, daß es sich dabei um Protoperithezien verschiedener Größen handelte.
Wie beispielsweise aus dem Vergleich von L-Arginin, d 4 und der Kontrolle, d 6 hervorgeht, zeigen diese Diagramme, daß die Fruchtkörperbildung durch L-Arginin um ca. 2 d beschleunigt wird. Die entsprechenden mikroskopischen Untersuchungen wiesen jedoch nach, daß auf dem Medium mit L-Arginin die Sporen bereits nach 6 d ausgeschleudert wurden. Ohne L-Arginin war dies jedoch erst nach 9 d der Fall. Daraus ist zu schließen, daß nicht nur die Bildung der Perithezienhülle, sondern auch die Sporenbildung durch L-Arginin beschleunigt wird.
Außerdem zeigt die Abb., daß auf dem Medium ohne L-Arginin (Kontrolle) das Maximum der Verteilung in der 5. Klasse liegt. Mit L-Arginin weist jedoch schon die 4. Klasse das Maximum auf. Daraus ist zu entnehmen, daß die Fruchtkörper auf dem Medium ohne L-Arginin etwas größer sind.

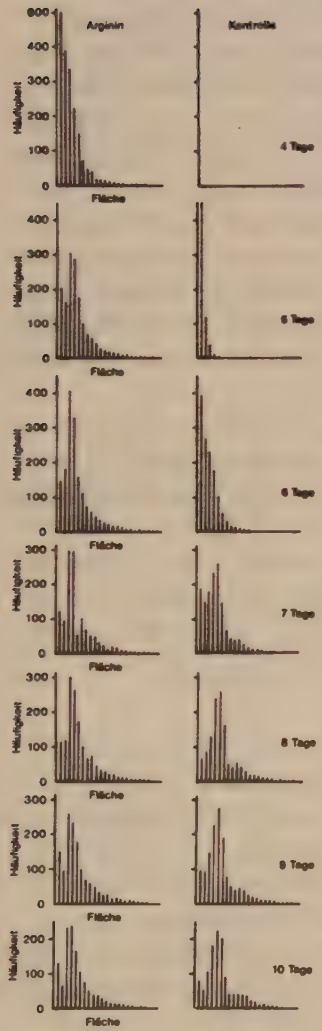


Abb. 15: Kontrolle der Fruchtkörperbildung durch L-Arginin. Häufigkeitsverteilung der tatsächlichen Perithezien-Flächen von 4 bis 10 d alten Kulturen von Sordaria macrospora bei An- und Abwesenheit von L-Arginin.

Klassenbreite: $1{,}71 \times 10^{-2}\,mm^2$, Mittelpunkt der ersten Klasse: $1{,}25 \times 10^{-2}\,mm^2$, Mittelwert von je 5 Testplatten.

b) Gesamtfläche aller Teilchen

Die Resultate der Perithezienbestimmung mit dem Bildanalysator zeigt die Abb. 16 a. Wie schon aus der Größenverteilung (Abb. 15) hervorgeht, sind die Perithezien auf dem Medium ohne L-Arginin etwas größer. Daher müssen die Werte der Gesamtflächen aller Teilchen korrigiert werden, um mit diesem Maß eine Aussage über die Zahl der Perithezien machen zu können. Nachdem durch L-Arginin die mittlere Fläche der Fruchtkörper auf 80% gesenkt wird, müssen die Werte der Gesamtflächen aller Teilchen auf dem Medium ohne L-Arginin um 20% erniedrigt werden, um einen Vergleich der Fruchtkörperbildung auf den beiden Medien zu ermöglichen. Mit L-Arginin wurde das Maximum der Fläche aller Teilchen (= Fruchtkörper) nach 5 d erreicht, während ohne L-Arginin dies erst nach 9 d der Fall war.
Außerdem wird aus der Abb. noch ersichtlich, daß durch den Zusatz von L-Arginin nicht nur die Geschwindigkeit der Fruchtkörperbildung, sondern auch die Zahl der Perithezien erhöht wird. Mit L-Arginin waren bereits nach 6 d reife Perithezien gebildet (Fläche = 550,78 mm^2) ohne L-Arginin, jedoch erst nach 9 d (Fläche = 378,08 mm^2). Daher wurde durch L-Arginin die Fruchtkörperbildung um 45,67% erhöht und um 3 d beschleunigt.

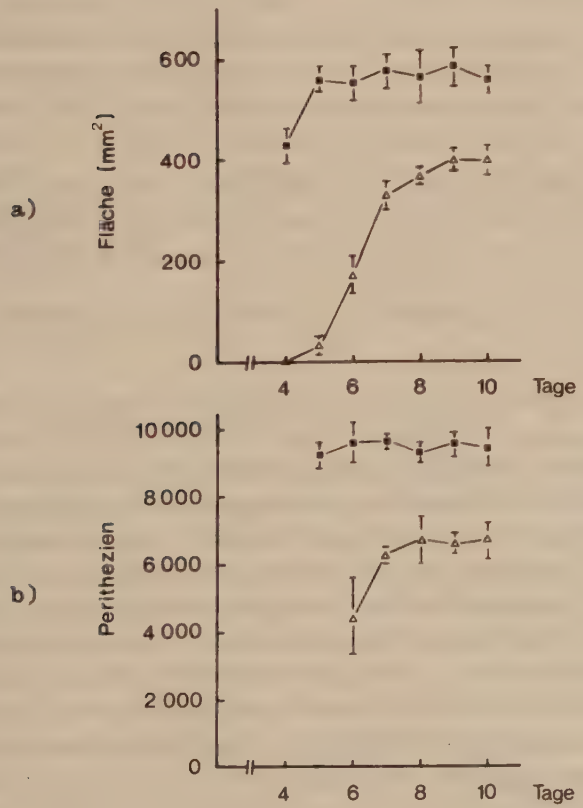
c) Zahl der Perithezien

Die Ergebnisse der manuellen Auszählung sind in Abb. 16 b dargestellt. Auch hier zeigt sich, daß durch L-Arginin die Entwicklung beschleunigt und die Zahl der Perithezien erhöht wird. Nach 6 d waren auf dem Medium mit L-Arginin 9610, ohne L-Arginin, jedoch nur 6600 Perithezien pro Platte vorhanden. Das heißt, daß durch L-Arginin die Fruchtkörperbildung um 45,60% erhöht und um 3 d beschleunigt wird.

Abb. 16: Einfluß von L-Arginin auf die Fruchtkörperbildung:
a) Messung mit dem Bildanalysator: Gesamtfläche aller Perithezien und ihrer Vorstufen (korrigierte Werte) pro Platte.
b) Manuelle Auszählung: Zahl der Perithezien pro Platte.

Fructose-Medium II: ■-■-■ mit L-Arginin
△-△-△ ohne L-Arginin

Mittelwert und Standardabweichung von je 5 Parallelproben.



d) Mittlere Perithezienfläche

Berechnet man die mittlere Perithezienfläche (f), wenn schon reife Fruchtkörper gebildet sind (nach 6 bzw. 9 d), indem man die Gesamtfläche aller Teilchen pro Platte (Bildanalysator-Auswertung, korrigierte Werte) durch die Zahl der Perithezien pro Platte (manuelle Auszählung) dividiert, so ergeben sich folgende Werte:

Medium mit L-Arginin (6 d) $f = 57.310{,}0\ \mu m^2$
Medium ohne L-Arginin (9 d) $f = 57.286{,}0\ \mu m^2$

Die Größe der Perithezien auf Fructose-Medium II wurde am Mikroskop mit dem Okularmikrometer bestimmt. Der mittlere Durchmesser der reifen Fruchtkörper betrug 270,0 µm, woraus sich die mittlere Perithezienfläche $f = 57.255{,}0\ \mu m^2$ ergibt.

Aufgrund der Uebereinstimmung dieser Werte sind damit auch die Korrekturfaktoren für die Auswertung am Bildanalysator bestätigt und die Genauigkeit der Bildanalyse dargestellt.

3.12. Spezifität der Wirkung von L-Arginin auf Fructose-Medium

Da auf Fructose-Medium II auch andere Aminosäuren eine geringe Stimulierung der Fruchtkörperbildung induziert hatten (vgl. 3.5.), wurde ein quantitativer Vergleich dieser Aminosäuren und anderer Stickstoffverbindungen durchgeführt. Dabei zeigte es sich, daß nur durch L-Arginin die größte Perithezien dichte erreicht und die Bildung von reifen Perithezien (= Sporen ausgeschleudert) innerhalb von 6 d induziert werden konnte. Die übrigen Substanzen ermöglichten die Fruktifikation in 7 bis 10 d. Außerdem wurden nur 22,5 - 80% der durch L-Arginin induzierten Perithezienzahl erreicht. Die Ergebnisse der manuellen Auszählung dieses Experiments sind in Tab. 8 dargestellt.

Tab. 8: Einfluß einiger Stickstoffverbindungen auf die Zahl und den Zeitpunkt der Fruchtkörperbildung. Als Medium wurde das Fructose-Medium II verwendet, wobei L-Arginin (1 mM) durch die aufgeführten Substanzen (1 mM) ersetzt wurde. Mittelwert und Standardabweichung von je 4 Parallelansätzen.

	$\bar{x}$	s	d
L-Arginin	9610	320	6
Ammoniumsulfat	7680	500	7
Harnstoff	7320	420	7
Ammoniumnitrat	6590	120	7
L-Asparaginsäure	5970	100	7
L-Asparagin	5960	120	7
L-Leucin	5690	340	7
Serin	6150	290	8
L-Lysin	5860	280	8
L-Threonin	5770	190	8
L-Histidin	2170	70	8
L-Cystein	6920	500	10
Kontrolle	6600	270	9

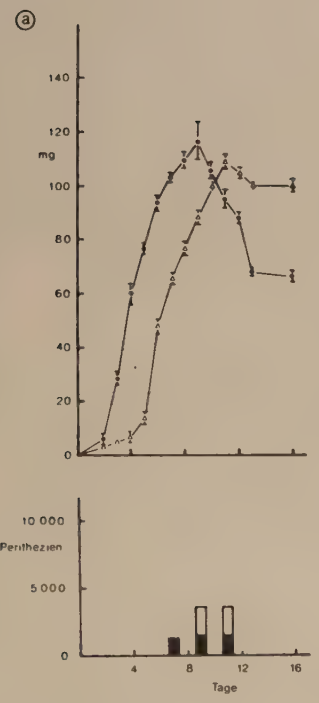
3.13. Analyse der Fruchtkörper-Induktion

Aus den bisherigen Ergebnissen ging hervor, daß durch alle Komponenten des Fructose-Mediums II die Fruktifikation von Sordaria beeinflußtwerden kann. Dabei erschienen die Komponenten L-Arginin und Biotin am bedeutsamsten, da schon aufgrund der geringen Konzentration der beiden Substanzen ein unspezifischer Ernährungseffekt ausgeschlossen werden kann. Außerdem zeigte es sich, daß in dem 2-Faktor-System Biotin einen qualitativen (Weiterentwicklung der Protoperithezien zu Perithezien), L-Arginin hingegen einen quantitativen Einfluß (Beschleunigung und Erhöhung der Fruchtkörperbildung) ausüben. Um nun die Wirkung dieser beiden Komponenten zu analysieren, wurden quantitative Bestimmungen der Parameter Wachstum und Fruchtkörperbildung in

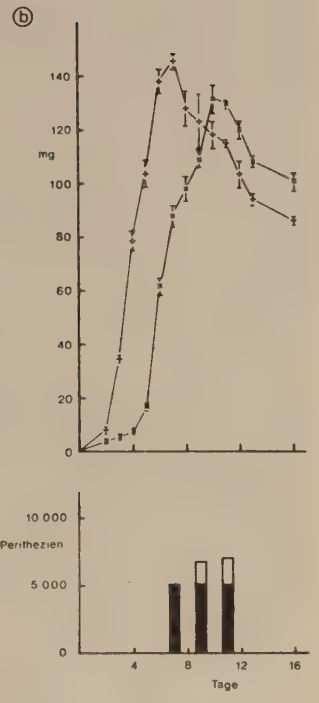
Abhängigkeit von L-Arginin und Biotin durchgeführt.

3.13.1. Der Einfluß von L-Arginin und Biotin auf Wachstum und Fruchtkörperbildung

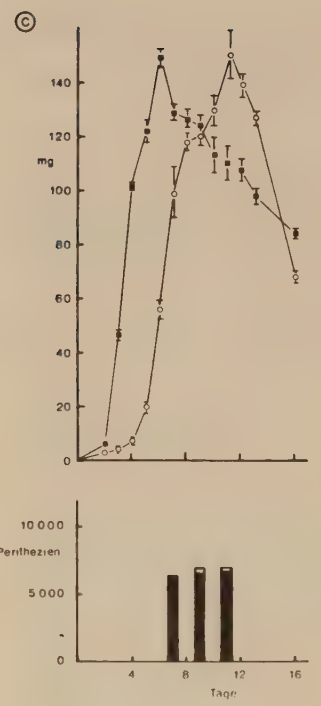
Für diese Experimente wurden die Standard-Medien Mais- und Stärke- sowie das Fructose-Medium II verwendet, wobei die Komponenten L-Arginin und Biotin variiert wurden (vgl. Abb. 17). Da Biotin einen qualitativen Effekt auf die Fruchtkörperbildung ausübt, wurde die Konzentration dieser Substanz über 5 Stufen variiert.
Als Maß für das Wachstum wurde das Myceltrockengewicht herangezogen. Spätestens von 4 d ab mußten hierbei jedoch die Perithezien und ihre Vorstufen berücksichtigt werden.
Die Fruchtkörperbildung wurde durch manuelle Auszählung ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abb. 17 dargestellt.
Durch L-Arginin wurde sowohl das Wachstum als auch die Perithezienbildung beschleunigt. Die Maxima der Trockengewichte und der Fruchtkörperbildung wurden mit L-Arginin bereits nach 6, ohne jedoch erst nach 9-11 d erreicht. Außerdem wurde deutlich, daß die Mycel-Masse der Perithezienzahl keinesfalls proportional ist. Der maximale Wert des Trockengewichts war ab einer Biotinkonzentration von 1,53 nM an von Biotin unabhängig. Daraus ist zu schließen, daß Biotin auch die Produktion der Mycel-Masse reguliert.
Ein Vergleich der Diagramme zeigt, daß pro Tag eine kritische Mycel-Masse gebildet werden muß, um eine Fruktifikation zu ermöglichen. Dies ist eine notwendige, aber keine hinreichende Bedingung für die Bildung von Perithezien. Aufgrund der Trokkengewichte der Mais-Medium-Kulturen kann man schließen, daß die kritische Menge pro Platte unter 25 mg Trockensubstanz pro Tag liegt.
Aus der Abb. geht ebenso hervor, daß die beschleunigende Wirkung von L-Arginin auf das Wachstum und die Fruchtkörperbildung unabhängig von der Biotinkonzentration ist. Allerdings wird durch L-Arginin auch eine frühere Verringerung des Trockengewichts, wahrscheinlich durch Autolyse, hervorgerufen. Für die Bildung von Perithezien ist jedoch in jedem



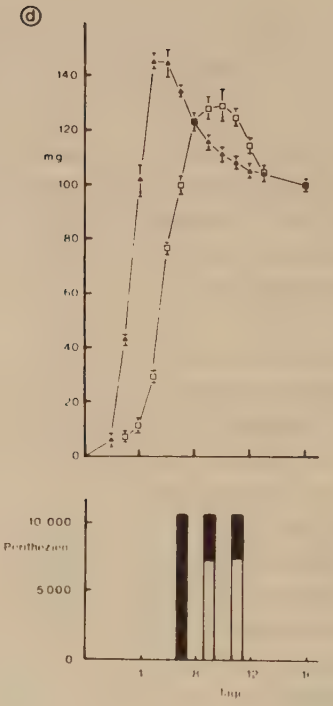
	Arginin	Biotin
●-●-●	1 mM	0,76 nM
△-△-△	–	0,76 nM



	Arginin	Biotin
÷-÷-÷	1 mM	1,53 nM
×-×-×	–	1,53 nM



	Arginin	Biotin
■-■-■	1 mM	3,07 nM
o-o-o	–	3,07 nM



	Arginin	Biotin
▲-▲-▲	1 mM	24,6 nM
□-□-□	–	24,6 nM

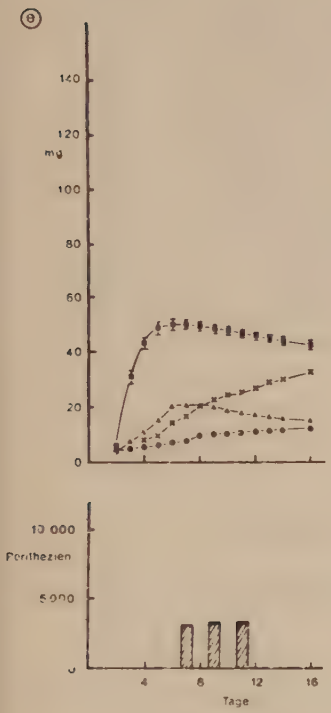


Abb. 17: Der Einfluß von L-Arginin und Biotin auf das Wachstum und die Fruchtkörperbildung.
In Abweichung von der sonst üblichen Darstellung wurden bei den Trockengewichten die Werte der Doppelbestimmungen und deren Mittelwerte eingezeichnet. Die Bestimmung der Fruchtkörperzahl erfolgte aus je 4 Testplatten. Alle Werte beziehen sich jeweils auf 1 Platte. Die Anzucht erfolgte auf Fructose-Medium II, wobei die Konzentrationen von L-Arginin und Biotin variiert wurden.

	Arginin	Biotin
-×-×-	–	–
-▲-▲-	1 mM	–
-■-■-	Mais	Medium
-●-●-	Stärke	Medium

Zahl der Perithezien:

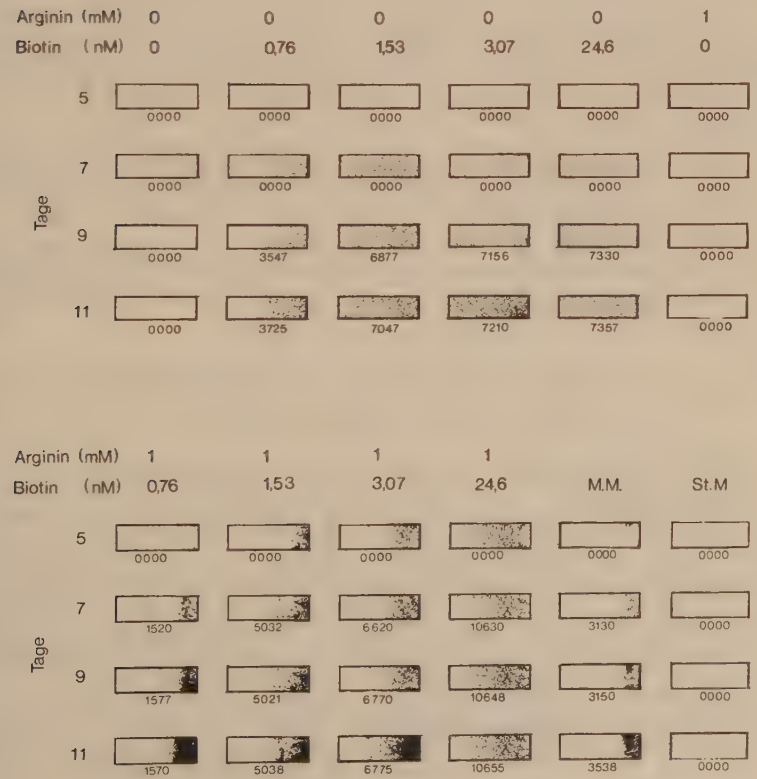
- Medium mit L-Arginin
- Medium ohne L-Arginin
- Mais-Medium

Falle Biotin notwendig. Eine Erhöhung der Perithezienzahl um 45% durch den Zusatz von 1 mM L-Arginin erfolgt nur bei optimaler Biotinkonzentration. Werden suboptimale Mengen von Biotin zugegeben, so bewirkt das L-Arginin sogar eine Verringerung der Fruchtkörperzahl, wobei auch die Bildung der Ascosporen beeinträchtigt wird. Beträgt die Biotinkonzentration unter 3,07 nM, so erfolgt ausschließlich die Bildung von anormalen Perithezien, die entweder leere Asci oder Asci mit unpigmentierten Sporen enthalten, die eine geringe Keimfähigkeit aufweisen (ca. 15%). Nur durch Biotinkonzentrationen über 3,07 nM werden normale Fruchtkörper mit keimfähigen Sporen (85%) gebildet.
Ein Vergleich der Perithezienbildung auf Fructose-Medium II (Abb. 17 d) und Mais-Medium (Abb. 17 e) zeigt, daß auf dem optimierten synthetischen Medium die Fruchtkörperzahl auf das Dreifache erhöht wird.

3.13.2. Fruchtkörperbildung und Pigmentierung

In der Literatur sind immer wieder Berichte über einen kausalen Zusammenhang zwischen der Fruchtkörperbildung und der Produktion von Pigmenten bei Pilzen zu finden (Westergaard und Hirsch 1954; Barbesgaard und Wagner 1959; Horowitz, Fling, MacLeod und Sueoka 1960; Cantino und Lovett 1964; Esser 1968; Leonard 1971; Leonard und Phillips 1973; Faro 1972; Marukawa, Funakawa und Satomura 1975 und Wilson 1970). Um nun die Zusammenhänge zwischen Fruchtkörperbildung und Pigmentierung bei Sordaria macrospora in Abhängigkeit von L-Arginin und Biotin zu demonstrieren, wurden die Testplatten des in Abschnitt 3.13.1. beschriebenen Experiments nach 5, 7, 9 und 11 d fotografiert. Ausschnitte der Petrischalen, die sowohl die Fruchtkörperbildung als auch die Pigmentierung zeigen, sind in Abb. 18 dargestellt.
Wie die Abb. zeigt, tritt auf dem natürlichen Mais-Medium nur im Bereich der Fruchtkörper eine dunkle Pigmentierung auf. Auf den synthetischen Medien ohne L-Arginin hingegen (0,76-24,60 nM Biotin) ist nur eine geringfügige Pigmentbildung zu erkennen, die allerdings bei der niedrigsten

Abb. 18: Fruchtkörperbildung und Pigmentierung in Abhängigkeit von L-Arginin und Biotin.
Die Versuche wurden mit Stärke- Mais- und Fructose-MediumII durchgeführt, wobei die Konzentrationen von L-Arginin und Biotin variiert wurden (vgl. Abb. 17).
M.M = Mais-Medium
St.M. = Stärke-Medium
In der Abb. sind Ausschnitte der Testplatten (4,0x1,5 cm) wiedergegeben. Die Anzahl an Perithezien wurde darunter gesetzt.
Die Ausbildung des Ostiolums und das Ausschleudern der Ascosporen dienten als Reifekriterium. Bei suboptimalen Biotin-Konzentrationen wurden allerdings nur sehr wenige, unpigmentierte Sporen ausgeschleudert.



Biotinkonzentration am deutlichsten ist (0,76 nM). Auf dem optimierten synthetischen Medium, Fructose-Medium II (mit L-Arginin), ist trotz der hohen Fruchtkörperzahl keine Pigmentierung zu sehen.
Dagegen wird durch suboptimale Biotinkonzentrationen mit L-Arginin nicht nur die Zahl der Perithezien gesenkt, sondern, ähnlich wie auf Mais-Medium, auch die Bildung eines dunkelbraunen Pigments hervorgerufen. Dabei werden auch die Perithezien nur im Bereich des Petrischalenrandes gebildet.

Aufgrund dieser Ergebnisse kann man für Sordaria macrospora unter diesen Bedingungen feststellen: Es besteht nur insofern ein Zusammenhang zwischen der Fruchtkörper- und der Pigmentbildung, als alle Fruchtkörper schwarze Farbstoffe eingelagert haben. Die Pigmentierung des Mycels ist jedoch nicht der Fruchtkörperbildung proportional, sondern hängt von L-Arginin und der Biotinkonzentration ab. Suboptimale Biotinmengen mit L-Arginin induzieren eine dunkle Pigmentierung.
Wie schon früher gezeigt wurde, ist es möglich, durch eine Erhöhung der Nitratkonzentration die Pigmentierung zu reduzieren (vgl. 3.10.).
Auf den Minimal-Medien, Stärke-Medium und Fructose-Medium II ohne L-Arginin und Biotin, tritt jedoch weder eine Fruchtkörperbildung noch eine Pigmentierung auf.

3.13.3. Der Einfluß von L-Arginin und Biotin auf die radiale Ausbreitungsgeschwindigkeit des Mycels

Da aus den vorhergehenden Experimenten zu entnehmen war, daß durch L-Arginin, unabhängig von Biotin, die Mycelbildung signifikant beschleunigt wird (vgl. 3.13.1.), aber aus meßtechnischen Gründen die Trockengewichtsbestimmungen erst 48 h nach der Beimpfung sinnvoll sind, wurde die Ausbreitungsgeschwindigkeit des Mycels auf den verschiedenen Medien gemessen, um so möglichst bald nach der Inokulation die Wirkung von L-Arginin und Biotin messen zu können. Die Anzucht erfolgte auf den 6 Standard-Medien. Die Ergebnisse

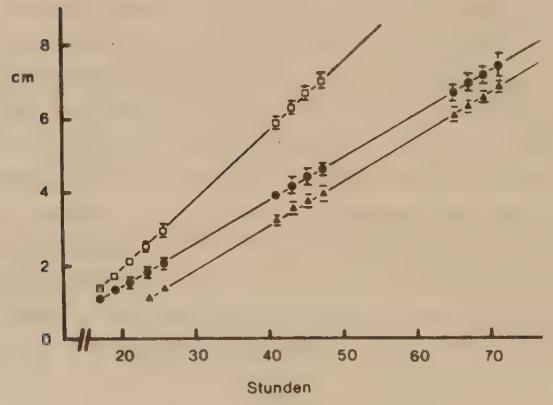
sind in Abb. 19 dargestellt.
Wie die Abb. zeigt, wird auf den Medien 1, 2, 5, und 6 eine lineare Ausbreitungsgeschwindigkeit des Mycels hervorgerufen. Auf dem Medium 3 hingegen, das L-Arginin, aber kein Biotin enthält, tritt nur während der ersten 25 h eine hohe Ausbreitungsgeschwindigkeit wie auf Medium 1 (mit L-Arginin und Biotin) auf, die allerdings nach dieser Zeitspanne von 25 h allmählich geringer wird.
Wenn das Medium nur Biotin, aber kein L-Arginin enthält (Medium 4), so ist ein reziprokes Verhalten zu beobachten, da in diesem Falle die Ausbreitungsgeschwindigkeit sukzessive zunimmt. Auffällig ist noch, daß nur auf einem Medium (Stärke-Medium) der Beginn der Ausbreitung des Mycels deutlich verzögert ist. Die erreichte Geschwindigkeit des radialen Wachstums ist aber identisch mit der auf dem 2. Minimal-Medium (weder L-Arginin noch Biotin). Der Grund für dieses Verhalten ist wohl in der notwendigen Hydrolyse des komplexen Kohlenhydratanteils zu sehen, während dies mit Fructose als Kohlenhydratquelle nicht notwendig ist. Im Mais-Medium hingegen liegt eine ausreichende Menge von Monosacchariden vor, da schon während der Extraktion des Maisschrotes (24 h) eine teilweise Hydrolyse stattgefunden hat.

3.13.4. Der Einfluß von Biotin auf die Aufnahme von L-Arginin

Um den Einfluß von Biotin auf die Aufnahme von L-Arginin in das Mycel zu untersuchen, wurde die Inkorporation von L-U^{14}C-Arginin gemessen. Für diese Experimente wurden Cellophankulturen auf Fructose-Medium II mit und ohne L-Arginin bzw. Biotin angezogen. Nach 3 d erfolgte unter sterilen Bedingungen das Ausstanzen der mit Mycel bewachsenen Cellophanscheibchen. Dabei war es sehr wichtig, daß die ausgestanzten Plättchen immer den gleichen Abstand zum Impfpunkt aufwiesen, da so ein vergleichbares Alter des Mycels gewährleistet werden konnte.

Abb. 19: Radiale Ausbreitung des Mycels von Sordaria macrospora in Abhängigkeit vom Nähr-Medium. Es wurden die Mittelwerte mit den Standardabweichungen von je 4 unabhängigen Messungen aufgetragen.

Medium		L-Arginin	Biotin
1	■-■-■	1,0 mM	24,6 nM
2	●-●-●	-	-
3	△-△-△	1,0 mM	-
4	○-○-○	-	24,6 nM
5	▲-▲-▲	Stärke-Medium	
6	□-□-□	Mais-Medium	



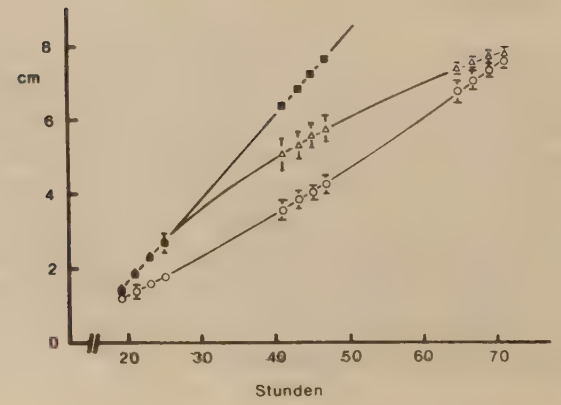
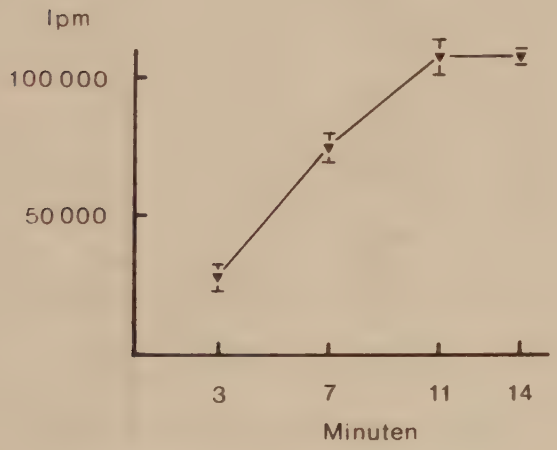


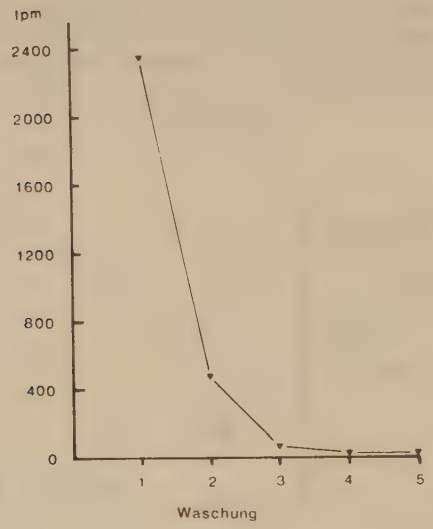
Abb. 20 zeigt die zeitabhängige Aufnahme von L-U^{14}C-Arginin pro mg Trockensubstanz bei 27°C, wobei als Inkubationsmedium Fructose-Medium II ohne L-Arginin verwendet wurde.

Abb. 20: Zeitabhängige Inkorporation von L-U^{14}C-Arginin. Als Inkubations-Medium wurde Fructose-Medium II ohne L-U^{12}C-Arginin verwendet. Die gemessenen Impulse beziehen sich auf mg Trockensubstanz. Mittelwerte mit Standardabweichung von je 3 Paralellproben.



Zur Zeit t = 0 wurden 0,25 µCi L-U^{14}C-Arginin (315 m Ci/mMol L-Arginin) zugegeben. Bereits nach 11 min Inkubation war eine Sättigung erreicht. Daher wurden für die Inkorporations-Experimente 5 min als Inkubationszeit und Fructose-Medium II gewählt.
Außerdem erfolgte eine Messung der Radioaktivität der Waschlösungen. Die Waschungen wurden mit Fructose-Medium II (mit und ohne Tween 80) durchgeführt. In beiden Fällen konnten gleiche Mengen von L-U^{14}C-Arginin in der Waschlösung nachgewiesen werden. Daher war anzunehmen, daß durch diese Methode an die Zellwand absorbiertes L-U^{14}C-Arginin entfernt worden war. Die Resultate der Messungen sind in Abb. 21 dargestellt.

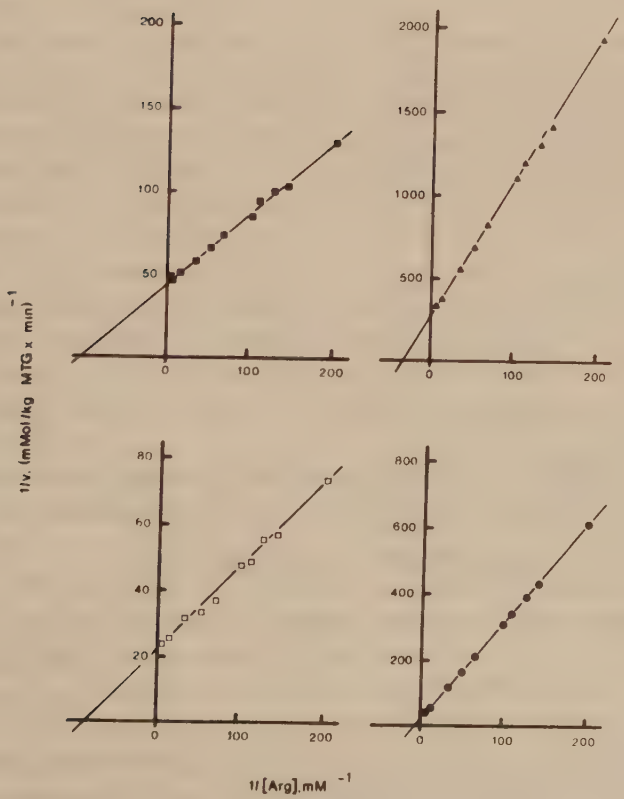
Abb. 21: Radioaktivität in den einzelnen Waschlösungen. Von je 25 ml Waschflüssigkeit wurde die Radioaktivität in je 5 ml bestimmt.



Die Messung des radioaktiven Einbaus erfolgte bei 10 verschiedenen L-Arginin Konzentrationen. Aufgrund der kurzen Inkubationszeit wurde die Aufnahmenrate von L-Arginin nicht durch das Biotin des Inkubations-Mediums beeinträchtigt. Dies konnte durch stichprobenartige Ueberprüfungen der Inkorporation von radioaktivem L-Arginin in das Mycel nachgewiesen werden, indem die andere Variante des Fructose-Mediums II (ohne Biotin und L-Arginin) als Inkubations-Medium verwendet wurde.
Da bekannt war, wieviel L-Arginin sich im Inkubations-Medium befand, konnte aufgrund der inkorporierten Radioaktivität die aufgenommene Menge an L-Arginin berechnet werden.

Abb. 22: Aufnahme von L-Arginin: Bestimmung von v_{max} und der apparenten Michaelis-Konstante. Es werden Mittelwerte aus je 5 Messungen gezeigt. Die Anzucht der Mycelien erfolgte auf den folgenden 4 Medien:

Medium		Arginin	Biotin
1.	●-●-●	1 mM	24,6 nM
2.	▲-▲-▲	1 mM	-
3.	□-□-□	-	24,6 nM
4.	■-■-■	-	-



Die Resultate der L-Arginin-Aufnahme sind nach Lineweaver-Burk in Abb. 22 graphisch dargestellt. Die Werte von v_{max} und die apparenten K_m-Werten wurden mit Regressionsanalysen ermittelt und in Tab. 9 zusammengefaßt.

Tab. 9: Einfluß des Anzucht-Mediums auf K_m-Wert und v_{max}

Medium	Arginin	Biotin	K_m (M)	v_{max} (Mol/kg MTG· min)
1.	1 mM	24,6 nM	$1,47 \cdot 10^{-4}$	$4,68 \cdot 10^{-5}$
2.	1 mM	-	$3,01 \cdot 10^{-5}$	$3,64 \cdot 10^{-6}$
3.	-	24,6 nM	$1,27 \cdot 10^{-5}$	$4,52 \cdot 10^{-3}$
4.	-	-	$9,97 \cdot 10^{-6}$	$2,27 - 10^{-5}$

Tab. 9 zeigt, daß durch Biotin die maximale Aufnahmegeschwindigkeit (v_{max}) von L-Arginin um etwa 2 Zehnerpotenzen erhöht wird (vgl. Medium 3 und 4), wenn die Anzucht des Mycels auf einem Medium ohne L-Arginin erfolgt.
Wurde jedoch das Mycel auf einem Medium mit L-Arginin kultiviert, so kann v_{max} durch Biotin nur um ca. 1 Zehnerpotenz erhöht werden (vgl. Medium 1 und 2). Dies läßt sich, da die Anzucht auf einem Medium mit L-Arginin erfolgt war, mit einer Sättigung durch L-Arginin erklären, wie es auch ein Vergleich der Medien 1 und 3 sowie 2 und 4 ersichtlich macht.
Die Ergebnisse dieses Experiments zeigen somit, daß die Aufnahme von L-Arginin durch Biotin beschleunigt werden kann.

3.13.5. Hemmung der Fruchtkörperbildung

Nachdem die bisherigen Ergebnisse gezeigt hatten, daß es möglich ist, die Perithezienbildung von S. macrospora durch die beiden Substanzen L-Arginin und Biotin zu modulieren und induzieren wurde versucht, die Fruchtkörperbildung auch spezifisch zu hemmen, um so die Wirkungsmechanismen der induzierenden Komponenten weiter zu analysieren.
Aus der Literatur war bekannt, daß die Fruchtkörperbildung

von Ascomyceten z.B. durch erhöhte Temperatur und verschiedene Inhibitoren blockiert werden kann: Westergaard und Mitchell (1947), Westergaard und Hirsch (1954), Hirsch (1954) und Viswanath-Reddy und Turian (1972, 1975) konnten an Neurospora spec. zeigen, daß durch erhöhte Temperatur (37°C) die Differenzierung reversibel gehemmt werden kann. Bei Sordaria fimicola wurde von Lindenmayer und Schoen (1967) nachgewiesen, daß die Entwicklung von Perithezien durch verschiedene Aza-Derivate von RNA-Basen, 5-Fluoruracil, Cyanid oder Azid sowie durch große Mengen von Kaseinhydrolysat selektiv blockiert werden kann.

a.) Avidin

Die bisherigen Ergebnisse hatten gezeigt, daß S. macrospora auf Fructose-Medium ohne Biotin nur Protoperithezien bilden kann. Da Biotin mit dem Eiklar-Protein Avidin einen stabilen 1:1 Komplex eingeht (Knappe 1970, Karlson 1971, Buddecke 1971) wurde versucht, das zugesetzte Biotin mit Avidin zu inaktivieren.
Dabei wurde einerseits die sterilfiltrierte Avidin-Lösung im Lochtest zugesetzt, andererseits mit abgekühltem Fructose-Medium II gemischt (55°C) und in Petrischalen ausgegossen.
Die Konzentration des zugesetzten Avidins wurde so variiert, daß die Hälfte bis zur tausendfachen Menge des vorhandenen Biotins hätte gebunden werden müssen. Sowohl im Lochtest als auch im Plattentest konnte jedoch keine hemmende Wirkung auf die Fruchtkörperbildung beobachtet werden. Beim Lochtest trat sogar im Bereich des ausgestanzten und mit Avidin-Lösung gefüllten Loches eine leichte Beschleunigung der Perithezienbildung auf.

b.) 5-Fluoruracil

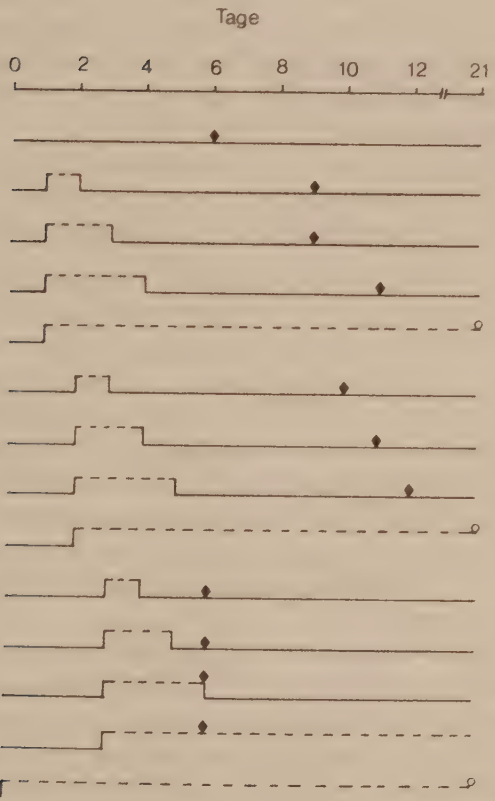
Da Biotin für die Pyrimidin-Synthese notwendig ist (Wellner, Santos und Meister 1968) und an S. fimicola (Lindenmayer und Schoen 1967) nachgewiesen worden war, daß 5-Fluoruracil die Fruchtkörperbildung selektiv blockiert, wurde an

S. macrospora versucht, mit diesem Basenanalogon die Bildung von Perithezien selektiv zu blockieren.
In Vorversuchen konnte gezeigt werden, daß die Perithezienbildung auf Fructose-Medium II durch den Zusatz von 10^{-5} M 5-Fluoruracil vollständig unterbunden werden kann und selbst nach 3 Wochen nur die Bildung von Protoperithezien möglich ist. Durch diese Behandlung erfolgte ebenso eine Herabsetzung der Ausbreitungsgeschwindigkeit des Mycels auf etwa ein Drittel. Außerdem konnte nachgewiesen werden, daß erst bei einer Konzentration von 10^{-2} M 5-Fluoruracil das Wachstum gehemmt wird.
Um nun die 5-F.U. sensitive Phase genau zu bestimmen, wurden Umsetz-Versuche durchgeführt. Dafür wurden Cellophankulturen angezogen (vgl. Abschnitt 2.7.), um das Mycel mit der Membran auf verschiedene Medien übertragen zu können. Nach 1-3 d Inkubation auf Fructose-Medium II erfolgte die Uebertragung auf das Medium mit 5-F.U. (für 1,2 und 3 d), danach die Rückübertragung auf Fructose-Medium II. Diese Experimente wurden auch reziprok durchgeführt, indem auf dem Medium mit 5-F.U. geimpft, nach 1-3 d für die gleiche Zeit auf Fructose-Medium II, dann wiederum auf 5-F.U. übertragen wurde.
Eine Darstellung der Ergebnisse erfolgte in Abb. 23. Die Abb. zeigt, daß auf Fructose-Medium II nach 6 d reife Fruchtkörper, auf 5-F.U.-Medium hingegen auch nach 21 d nur Protoperithezien gebildet werden (erste und letzte Zeile). Die Uebertragung auf 5-F.U. (für 1-3 d) nach 24 und 48 stdg. Inkubation auf Fructose-Medium II bewirkte eine zeitliche Verschiebung der Fruktifikation. Wurden die Mycelien allerdings nicht auf 5-F.U.-freies Medium rückübertragen, so konnten nur Protoperithezien gebildet werden. Erfolgte jedoch die Uebertragung auf 5-F.U.-Medium nach 3 d Wachstum auf Fructose-Medium II, so wurden, wie bei der Kontrolle nach 6 d, reife Perithezien gebildet.

Die Ergebnisse des reziproken Experiments sind in Abb. 24 dargestellt.
Erfolgte die Uebertragung auf Fructose-Medium II nach 1 tägiger Inkubation auf 5-F.U.-Medium, so konnte nur dann eine, wenn auch zeitlich verzögerte Fruchtkörperbildung induziert werden,

Abb. 23: Einfluß von 5-Fluoruracil auf die Perithezienbildung von Sordaria macrospora. Die Anzucht erfolgte auf Fructose-Medium II mit Cellophankulturen. Die Stufen im Verlauf der Zeilen symbolisieren die Übertragung auf ein anderes Medium.

——— Fructose-Medium II
------ Fructose-Medium II mit 10^{-5} M 5-F.U.
o Protoperithezien
♦ reife Perithezien mit ausgeschleuderten Sporen.

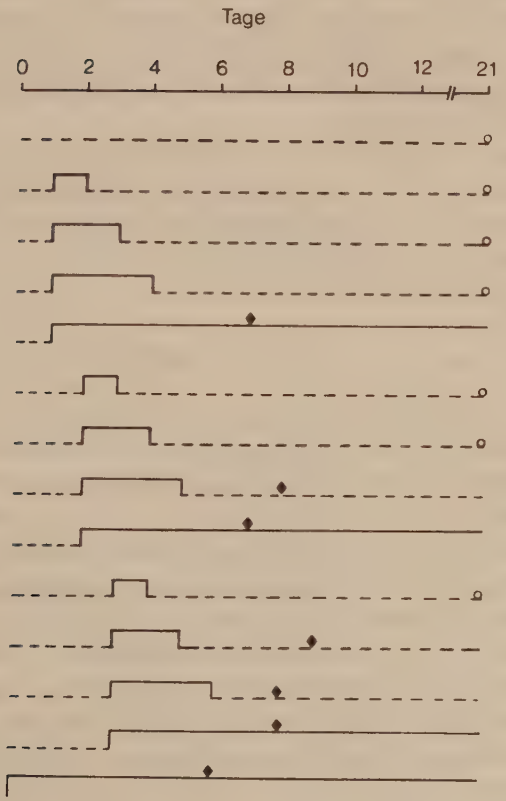


wenn die Verweildauer auf 5-F.U.-freiem Medium länger als 3 d war (vgl. Zeile 4 und 5).
Wurden die Kulturen jedoch zuerst 2 d auf 5-F.U.-Medium inkubiert, so erfolgte nur dann eine um 1-2 d verzögerte Bildung von Perithezien, wenn die Inkubation auf 5-F.U.-freiem Medium mindestens 3 d betrug (vgl. Zeile 8 und 9).
Erfolgte jedoch die Uebertragung auf Fructose-Medium II erst nach 3 tägiger Kultivierung auf dem 5-F.U.-Medium, so genügen schon 2 d Verweildauer, um trotz der Rückübertragung eine zeitlich verzögerte Frucktifikation zu bewirken. Für den Zeitpunkt der Perithezienbildung ist es dabei jedoch nicht von Bedeutung, ob die Verweilzeit auf 5-F.U.-freiem Medium 3 oder 5 d beträgt (vgl. Zeile 12 und 13), da in beiden Fällen die Fruchtkörperbildung im Vergleich zur Kontrolle um 2 d verschoben wird.
Dauert die Inkubation auf Fructose-Medium II jedoch nur 2 d (nach 3 tägiger Kultivierung auf 5-F.U.-Medium), so erfolgt eine zeitliche Verzögerung der Perithezienbildung um 3 d.

Aus den Ergebnissen ist zu schließen, daß die 5-F.U. sensitive Phase der Perithezienbildung kürzer als 72 h ist, falls die Inokulation auf Fructose-Medium II erfolgt. Außerdem ist es für die zeitliche Verzögerung der Fruchtkörperbildung unerheblich, ob der Transfer auf 5-F.U.-Medium nach 24 oder 48 stdg. Inkubation auf Fructose-Medium II erfolgt. Die in Abb. 23 dargestellten Ergebnisse zeigen weiterhin, daß die für die Regulation der Perithezienbildung maßgeblichen Prozesse bei Inokulation auf Fructose-Medium II in der Zeit von 48-72 h nach der Beimpfung abgelaufen oder durch 5-F.U. nicht mehr zu hemmen sind.
Aus den in Abb. 24 dargestellten Ergebnissen des reziproken Versuchs geht hervor, daß es von der Inkubationsdauer nach der Beimpfung auf 5-F.U.-Medium abhängt, wie lange auf Fructose-Medium II weiterinkubiert werden muß, um die Fruktifikation zu ermögichen. - Nach 3 d Inkubation auf 5-F.U.-Medium genügen schon 2 d Kultivierung auf Fructose-Medium II, um eine Perithezienbildung zu induzieren.

Abb. 24: Einfluß von 5-F.U. auf die Fruchtkörperbildung von Sordaria macrospora. Die Anzucht erfolgte auf Fructose-Medium II mit 10^{-5} M 5-F.U., wobei Cellophankulturen verwendet wurden. Die Stufen im Verlauf der Zeilen symbolisieren die Uebertragung auf ein anderes Medium.

——— Fructose-Medium II
------ Fructose-Medium II mit 10^{-5} M 5-F.U.
o Protoperithezien
♦ reife Perithezien mit ausgeschleuderten Sporen.



Daraus kann gefolgert werden, daß auch während des Wachstums auf 5-F.U.-Medium (vor der Uebertragung auf Fructose-Medium II), trotz des Inhibitors Prozesse ablaufen können, die für die Fruchtkörperbildung von Bedeutung sind.

c.) L-Canavanin

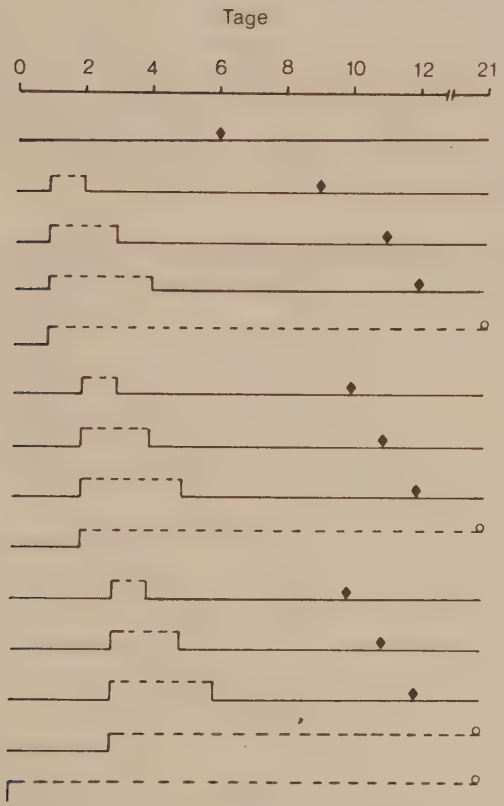
Aus den Ergebnissen ging außerdem hervor, daß die Geschwindigkeit und der Umfang der Perithezienbildung durch L-Arginin beträchtlich gesteigert werden kann. Daher wurde untersucht, ob es möglich ist, mit dem L-Arginin-Antagonisten L-Canavanin (Shive und Skinner 1963, Leising, Haas und Hegarty 1972, Metzner 1973, Leisinger, O'Sullivan und Haas 1974 sowie Silbernagel 1974) das Wachstum oder die Fruchtkörperbildung zu hemmen.
Dabei zeigte es sich, daß die Dauer des Entwicklungszyklus durch den Zusatz von L-Canavanin auf 7 d verkürzt wird. Eine Steigerung der Perithezienzahl im Vergleich zur Kontrolle konnte dabei allerdings nicht festgestellt werden.

d.) Erhöhte Inkubationstemperatur

Nachdem sowohl bei Neurospora spec., wie schon erwähnt, als auch bei S. macrospora (vgl. Abschnitt 3.2.) die Entwicklung von Fruchtkörpern durch eine Erhöhung der Temperatur inhibiert werden kann, wurde nun untersucht, ob auch bei S. macrospora eine temperatur-sensitive Phase existiert, wie das bei Neurospora tetrasperma von Viswanath-Reddy und Turian (1975) gezeigt werden konnte. Um den Einfluß von erhöhter Temperatur (36°C) auf die Differenzierung der Perithezien in Abhängigkeit vom Alter der Kultur und der Dauer der Temperatur-Behandlung zu bestimmen, wurden - in Analogie zu den Umsetz-Versuchen mit 5-F.U. - Experimente bei 27°C und 36°C durchgeführt. Die Ergebnisse zeigt die Abb. 25.

Abb. 25: Einfluß erhöhter Inkubationstemperatur auf die Entwicklung von Fruchtkörpern bei Sordaria macrospora. Die Anzucht erfolgte auf Fructose-Medium II. Die Stufen symbolisieren den Uebergang auf eine andere Inkubationstemperatur:

——— 27°C Fructose-Medium II
------ 36°C Fructose-Medium II mit 10^{-5} M 5-F.U.
○ Protoperithezien
♦ reife Perithezien mit ausgeschleuderten Sporen.



Die Abb. zeigt, daß die Dauer der Fruchtkörperbildung durch einen zeitlich begrenzten Einfluß von erhöhter Temperatur nur verlängert wird. Dabei ist allerdings die zeitliche Verzögerung der Perithezienbildung nur von der Inkubationsdauer mit erhöhter Temperatur abhängig, nicht jedoch vom Zeitpunkt, an dem die Inkubationstemperatur erhöht wird. Im Gegensatz zu den 5-F.U.-Versuchen ist die Bildung von Fruchtkörpern auch nach 3 d Inkubation bei 27°C durch eine Uebertragung zu der höheren Temperatur (36°C) zu hemmen.
Durch eine Inkubation bei 36°C kann sowohl die Bildung als auch die Pigmentierung der Ascosporen inhibiert werden, indem entsprechende Kulturen nur mehr bei 36°C inkubiert werden. In jedem Fall ist die durch die erhöhte Temperatur hervorgerufene Hemmung der Entwicklung zu revertieren, wenn die Inkubationstemperatur auf 27°C gesenkt wird.

3.14. Vergleich der Entwicklung einiger Stämme von Sordaria macrospora auf den Standard-Medien

Die Ergebnisse der bisherigen Analyse der Fruchtkörperbildung bezogen sich ausschließlich auf den Stamm K^+d. Dabei konnte gezeigt werden, daß Biotin für die Differenzierung von Protoperithezien zu Perithezien unbedingt notwendig ist und durch L-Arginin der Entwicklungszyklus beträchtlich beschleunigt wird.
Esser und Straub (1958) konnten eine Reihe von Mutanten isolieren, die auf verschiedenen Stadien der Entwicklung blokkiert sind. Mit einigen dieser Stämme (vgl. Abschnitt 2.2., Tab. 1) wurde eine vergleichende Untersuchung der Entwicklung auf den 6 Standard-Medien (Stärke-Medium, Mais-Medium, Fructose-Medium II mit und ohne L-Arginin bzw. Biotin) durchgeführt. Damit sollte überprüft werden, ob den bei K^+d gefundenen Ergebnissen eine allgemeine Gültigkeit zugeschrieben werden kann. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt in Tab. 10.

Tab. 10: Einfluß des Nähr-Mediums auf die Entwicklung einiger Stämme von Sordaria macrospora. Die Dauer der Beobachtung betrug 6 d.

Stamm	Mais-Medium	Fructose-Medium II	Fructose-Medium II ohne Biotin	Fructose-Medium II ohne L-Arginin	Fructose-Medium II ohne Biotin und L-Arginin	Stärke-Medium
K^+h	Peri.	Peri.	wenige Peri. mit def. Asci	wenige Peri.	wenige Peri.	wenige Peri. mit def. Asci
K^+d	Peri.	Peri.	Ascogone	Peri.	Protoperi.	Protoperi.
lu	Peri.	Peri.	wenige Peri. mit def. Asci	wenige Protoperi.	wenige Peri.	wenige Peri. mit def. Asci
pl	Protoperi.	Protoperi.	Protoperi.	Protoperi.	Mycel	Protoperi.
f_1	Protoperi.	Ascogone	Ascogone	Ascogone	Ascogone	Protoperi.
pal	Protoperi.	Protoperi.	Protoperi.	Protoperi.	Protoperi.	Protoperi.
pr	Protoperi.	Ascogone	Ascogone	Ascogone	Ascogone	Ascogone
cit	Ascogone	Protoperi.	Mycel	Protoperi.	Mycel	Mycel
me	Protoperi.	Protoperi.	Protoperi.	Protoperi.	Protoperi.	Protoperi.
spd	Ascogone	Ascogone	Ascogone	Ascogone	Ascogone	Ascogone

Peri. = Perithezien
Protoperi. = Protoperithezien
def. = defekt

Die Tab. zeigt, daß die getesteten Stämme in 4 Gruppen eingeteilt werden können:

A) Die vollständige Entwicklung findet auch ohne den Zusatz von Biotin und L-Arginin statt:
K^+h, lu

B) Die Entwicklung ist ohne den Zusatz von Biotin unvollständig:
K^+d, pl, cit

C) Die Entwicklung wird durch Komponenten des synthetischen Mediums blockiert:
pr, f_1

D) Die Entwicklung wird durch die getesteten Medien nicht beeinflußt:
me, spd

Die Stämme K^+h und lu sind in der Lage, auf den synthetischen Medien auch ohne L-Arginin und Biotin eine geringe Anzahl von Perithezien zu bilden. Diese Fruchtkörper beinhalten jedoch meist leere Asci oder Asci mit unpigmentierten Sporen, die eine geringe Keimfähigkeit (15%) aufweisen.
Dabei zeigt ein visueller Vergleich der Testplatten, daß die Zahl der Perithezien auf den 6 Medien sehr unterschiedlich ist. Allerdings besteht zwischen den beiden Stämmen K^+h und lu kaum ein Unterschied bezüglich der Fruchtkörperdichte auf gleichen Medien.
Um nun einen Vergleich zwischen der Perithezienbildung von K^+d und einem der beiden Stämme zu ziehen, die auch ohne L-Arginin und Biotin eine geringe, anormale Fruchtkörperbildung aufweisen, wurde die Fruktifikation von K^+h und K^+d auf den 6 Standard-Medien quantitativ bestimmt. Die Auszählung der Perithezien (normal und anormal) erfolgte nach 7 und 9 d. Die Resultate sind in Tab. 11 dargestellt.

Tab. 11: Quantitativer Vergleich der Perithezienbildung (manuelle Auszählung) von K^+d und K^+h. Die Anzucht erfolgte auf den 6 Standardmedien: Stärke-, Mais-Medium und Fructose-Medium II mit und ohne L-Arginin bzw. Biotin

		F-M II	F-M II ohne L-Arginin	F-M II ohne Biotin	F-M II ohne L-Arginin und Biotin	Mais-Medium	Stärke-Medium
7 Tage	K^+d	9660	0	0	0	3030	0
	K^+h	2307	513	315	677	1974	93
9 Tage	K^+d	9680	6769	0	0	3045	0
	K^+h	2310	521	325	675	1970	97

F-M II = Fructose-Medium II

Die Tab. zeigt, daß die Perithezienbildung von K^+h auf Fructose-Medium II durch den Zusatz von L-Arginin nicht wie bei K^+d um 3 d beschleunigt sondern nur um 349,7% erhöht wird (bei K^+d nur um 42,7%). Allerdings ist die Fruchtkörperbildung von K^+h auf den beiden Vollmedien wesentlich geringer als die von K^+d. Auf dem Mais-Medium werden im Vergleich zu K^+d nur 65,14%, auf Fructose-Medium II nur 23,8% der Peritheziendichte erreicht.

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, daß K^+h selbst mehr Biotin produzieren kann als K^+d, da dieser Stamm auch ohne Biotin-Zusatz eine, wenn auch geringe, Zahl (14,1%) anormaler Perithezien bilden kann. Wird jedoch dem Medium Biotin zugesetzt, so werden normale Perithezien gebildet und die Zahl der Fruchtkörper beträchtlich erhöht.

Ein Vergleich mit den Experimenten in Abschnitt 3.12.1. zeigt, daß auch bei K^+d durch suboptimale Biotin-Konzentration die Bildung von wesentlich weniger (14,28%) und ebenfalls anormalen Perithezien induziert werden kann.
Die Tatsache, daß K^+h auf dem optimalen synthetischen Medium weniger Perithezien bildet als K^+d ist darauf zurückzuführen, daß dieses Fructose-Medium II mit K^+d optimiert wurde und K^+h generell eine geringere Fruchtkörperbildung aufweist, wie der Vergleich der Peritheziendichten auf Mais-Medium zeigt (vgl. Tab. 10).

4. DISKUSSION

Alle Organismen durchlaufen eine Sequenz vorprogrammierter Aenderungen, in denen Strukturen durch komplizierte Wechselwirkungen zwischen dem Organismus und externen Einflüssen aufgebaut und transformiert werden. Bis heute ist es jedoch noch nicht gelungen, die Sequenz, die von der genetischen Information bis zur Form-Bildung führt, zu erklären.

Bei Pilzen existieren zahlreiche Beispiele dafür, daß die Steuerung von morphogenetischen Prozessen durch chemische Faktoren erfolgen kann. Bei einigen Vertretern der Phycomyceten konnte nachgewiesen werden, daß die Ausbildung der Geschlechtsorgane durch organismuseigene Substanzen induziert wird [z.B. Antheridiol und verwandte Gamone bei Achlya ambisexualis (Raper 1951, 1952, 1960), Sirenin bei Allomyces (Machlis 1958 a, b, c, Machlis, Williams und Rapoport 1966, Machlis, Nutting und Rapoport 1968, Machlis 1972) sowie "Trisporic acid" bei Mucor mucedo (Gooday 1968, Austin, Bu Lock und Gooday 1969, Gooday 1974)]. In der Mehrzahl der Fälle werden jedoch Phänomene beschrieben, die auf einen entscheidenden Einfluß von externen Faktoren schließen lassen. Als Beispiel für die Regulation eines derartigen Differenzierungsvorgangs wurde die Fruchtkörperbildung von Sordaria macrospora untersucht. Um Einflüsse von Außenfaktoren auf die Perithezienbildung von S. macrospora untersuchen zu können war es notwendig, ein synthetisches Medium zu finden, das aus möglichst wenigen Komponenten zusammengesetzt ist, damit die Zahl der externen Faktoren möglichst gering ist. Außerdem sollte das Medium eine optimale Fruchtkörperbildung ermöglichen, damit bei der Messung von physiologischen und biochemischen Prozessen aus meßtechnischen Gründen keine Limitierungen auftreten können. Wie aus den Ergebnissen hervorgeht, genügen die 7 Komponenten Fructose (bzw. Stärke), KNO_3, KH_2PO_4, $MgSO_4$, $ZnSO_4$,

L-Arginin und Biotin, um eine Perithezienbildung zu induzieren, die auf den bisher verwendeten natürlichen Medien (z. B. Mais-Medium) bei weitem nicht erreicht werden kann.
Nachdem jedes Medium zwangsläufig ein multifaktorielles System darstellt, kann jede der Komponenten limitierend wirken. Mit Hilfe der Faktorenanalyse ist es jedoch möglich, die spezifischen Effekte der einzelnen Faktoren getrennt darzustellen. Nachdem in diesem System für die Fruchtkörperbildung 5 Komponenten unbedingt erforderlich sind, erhebt sich die Frage, welcher der Faktoren der wichtigste für die Kontrollmechanismen der Fruktifikation ist. Es ist grundsätzlich möglich, Faktorenanalysen zu erstellen, aus denen der Beitrag jeder der Komponenten an den morphogenetischen Prozessen ermittelt werden könnte. In derartigen Versuchskomplexen müßten jedoch neben den morphologischen Kriterien auch biochemische und molekularbiologische Aspekte Beachtung finden. Da jedoch einerseits die Prozesse weitgehend unbekannt sind, andererseits kausale Rückschlüsse von morphologischen Beobachtungen auf biochemische Prozesse in diesem Falle nicht sinnvoll erscheinen, wurde bei der Faktorenananlyse ein Mittelweg zwischen den sehr komplexen multifaktoriellen Analysen und der allgemein üblichen Methode - jeweils nur einen essentiellen Faktor zu variieren - gewählt. Dabei wurden die Komponenten konstant gehalten, die aufgrund ihrer Konzentration vermuten ließen, daß es sich bei ihrer Wirkung auf die Fruchtkörperbildung um unspezifische Nahrungseffekte handelt. Ebenso wurde mit denjenigen Substanzen verfahren, die nur eine geringe Erhöhung der Peritheziendichte bewirken und daher für die Fruktifikation nicht unerläßlich sind.
Die Ergebnisse zeigten, daß die Fruchtkörperbildung von S. macrospora durch die beiden Komponenten L-Arginin und Biotin spezifisch kontrolliert wird.

L-Arginin:

Die Wirkung von L-Arginin auf die Fruchtkörperbildung ist als spezifisch anzusehen, da einerseits die Konzentration im Medium (1 mM) viel zu gering ist um auf einem unspezifischen Nahrungseffekt zu beruhen, andererseits steht fest, daß nur durch L-Arginin die Dauer des Entwicklungszyklus auf 6 d verkürzt wird. Weiterhin kann durch keine andere Substanz außer durch L-Arginin die Zahl der Fruchtkörper in einem solchen Ausmaß erhöht werden.
Die Spezifität der Wirkung von L-Arginin auf die Perithezienbildung hängt von der Kohlenhydrat-Quelle ab. Bisher ist noch ungeklärt, warum L-Arginin nur auf Stärke die Geschwindigkeit und die Differenzierung von Protoperithezien zu Perithezien reguliert, während auf Fructose durch L-Arginin nur die Geschwindigkeit und die Zahl der Perithezien erhöht wird.
Nachdem Stärke keine einheitliche Substanz ist und aufgrund der mangelnden Reinheitskriterien kann man annehmen, daß noch vorhandene Verunreinigungen mit L-Arginin zusammen den qualitativen und beschleunigenden Effekt hervorrufen.

Wie die Ergebnisse zeigten, wird L-Arginin vom Mycel aufgenommen. Die Tatsache, daß L-Arginin der beste Induktor für die Perithezienbildung ist, könnte auf ein für L-Arginin günstiges Transportsystem zurückgeführt werden. Quay und Christensen (1974) konnten bei Bac. subtilis 2 verschiedene Transport-Systeme für L-Arginin nachweisen, ein spezifisches System für L-Arginin und ein System für L-Arginin, L-Ornithin und L-Lysin.
Die Ergebnisse der Inkorporationsexperimente bei S. macrospora weisen jedoch im Gegensatz zu Bac. subtilis nicht darauf hin, daß 2 Transport-Systeme für L-Arginin vorhanden sind. In jedem Falle wird jedoch die Aufnahme von L-Arginin durch Biotin, in Abhängigkeit von L-Arginin, um 1 bzw. 2 Zehnerpotenzen erhöht.

Außerdem haben bei Neurospora eine Reihe von Berichten (De Busk und De Busk 1965, Pall 1970, Roess und De Busk 1968, Thwaites und Pendyala 1969) gezeigt, daß letztlich 4 Transport-Systeme vorhanden sind: je eines für L-neutrale, L-basische und saure Aminosäuren sowie ein generelles System für D- und L-neutrale und -basische Aminosäuren.

Weitere Experimente sollen klären, wie bei S. macrospora L-Arginin im Mycel verteilt wird. Ebenso soll aufgrund von Pulsmarkierungsexperimenten festgestellt werden, zu welchen Verbindungen die Aminosäure metabolisiert wird, wenn der Pilz mit und ohne L-Arginin bzw. Biotin kultiviert wurde.
Unabhängig von Biotin wird durch L-Arginin sowohl die Ausbreitungsgeschwindigkeit als auch die Myceldichte stark gesteigert. Daraus ergibt sich, daß durch L-Arginin eine Erhöhung der Zellwand-Synthese erfolgt. Auch durch mechanische Vorrichtungen die eine Mycelverdichtung bewirken, (z.B. V-ähnliche Hindernisse oder den Petrischalenrand) kann die Fruchtkörperbildung induziert werden. Daraus ist zu schließen, daß das Ueberschreiten einer kritischen Hyphendichte eine notwendige, aber keine hinreichende Bedingung für die sexuelle Reproduktion ist. Allerdings ist eine Induktion durch mechanische Vorrichtungen ausschließlich auf Mais-Medium möglich, jedoch nicht auf Fructose-Medium II. Wie die Trokkengewichtsbestimmungen zeigten, wird auf Fructose-Medium II etwa die 3-fache Menge an Mycel gebildet. Dies erklärt auch, warum nur auf Mais-Medium die Perithezienbildung durch Hindernisse induziert werden kann, nicht aber auf Fructose-Medium II, da auf Mais-Medium die kritische Hyphendichte nur durch einen zusätzlichen, hyphenverdichtenden Stimulus überschritten wird.

Das Ueberschreiten einer kritischen Hyphendichte als Voraussetzung für die Fruchtkörperbildung ist wie folgt zu verstehen:

Für die Bildung eines Peritheziums ist ein großer Aufwand an Syntheseleistungen notwendig. Die Hüllhyphen bzw. Perithezienhüllen und Ascosporen werden nur dann gebildet, wenn genügend Vorstufen für Protein-, Zellwand- und Nucleinsäure-Synthesen zu einem bestimmten Ort, dem Ascogon bzw. Protoperithezium gebracht werden. Dies geschieht mit Hilfe der Plasmaströmung aus dem umgebenden Mycel. Ist nun die Myceldichte sehr gering, so müßte, um die notwendigen Substanzen zu transportieren, einerseits die Plasmaströmung den Transport über verhältnismäßig weite Strecken vollziehen, andererseits müßte noch dazu die Geschwindigkeit der Plasmaströmung erhöht werden, um so genügend Reservestoffe pro Zeiteinheit für die diversen Synthesen anliefern zu können. Beiden Möglichkeiten sind jedoch aus physikalischen Gründen Grenzen gesetzt. Außerdem werden in älteren Hyphen sehr rasch große Vakuolen gebildet, die für einen optimalen Transport äußerst ungünstig sind.

Daher erscheint es zweckmäßiger und effizienter, daß sich Fruchtkörper nur im Bereich eines dichten Mycels differenzieren können, um so einen optimalen Transport von Reservestoffen sicherzustellen. Dabei erhebt sich die Frage nach der Art des Transports. Da bei Pilzen nur ein Spitzen-Wachstum stattfindet, ist kaum anzunehmen, daß sich Konzentrationsgradienten über weitere Strecken in den Hyphen ausbilden, um zum Ort des Verbrauchs (der Spitzenregion) die nötigen Substanzen zu transportieren. Unter diesen Umständen erscheint der Transport von Reservestoffen in Vesikeln als äußerst günstig, da so keine gravierenden Aenderungen der im Cytoplasma gelösten Substanzen bzw. des osmotischen Wertes auftreten können. Somit könnten die Kompartimente gezielt zum Ort des Bedarfs, an die Hyphenspitzen-Region gelangen, wobei der Transport schnell (annähernd mit Plasmaströmungsgeschwindigkeit) vonstatten gehen kann und es außerdem möglich ist, be-

trächtliche Konzentrationen zu transportieren, ohne die osmotischen Verhältnisse des Cytoplasmas zu stören.

Auch bei anderen Ascomyceten konnte nachgewiesen werden, daß die Bildung von reproduktiven Organen durch Hindernisse stimuliert werden kann. Buston und Rickard (1956) zeigten an Chaetomium globosum, daß die Perithezienbildung mit dem Anstoßen der Hyphen an die Petrischalenwand und der Anhäufung von phosphorylierten Intermediärprodukten des Kohlenhydrat-Stoffwechsels verbunden ist. Daher wurden Phosphorylierungsprodukte als mögliche Induktoren für die sexuelle Reproduktion postuliert, wobei die physikalische Barriere die Diffusion der ausgeschiedenen Substanzen verhindert, so daß eine kritische Konzentration erreicht wird.
Bei Gelasinospora reticulispora konnten Inoue und Furuya (1970) nachweisen, daß eine Induktion der Fruchtkörperbildung durch das Anstoßen von Hyphen erreicht werden kann. In diesem Falle sind sogar 2 unabhängige Induktoren für die Bildung von Fruchtkörpern vorhanden, einerseits die physikalische Barriere, andererseits das Licht.
Bei Sordaria fimicola (Pollock 1953) sind Berichte über die Stimulierung der Fruktifikation am Petrischalenrand bekannt. Der Autor fordert dabei einen von reifen Perithezien diffundierenden Inhibitor, da Protoperithezien in unmittelbarer Nachbarschaft von reifen Fruchtkörpern sich nicht weiterentwickeln können. Ein Nachweis dieses Inhibitors gelang bis jetzt allerdings noch nicht. Außerdem ist dieses Phänomen auch sehr leicht durch den Verbrauch der Reservestoffe aus dem Mycel für die bereits erfolgte Bildung des Peritheziums zu erklären, so daß die für das benachbarte Protoperithezium notwendigen Synthesen limitiert sind.

Ein kausaler Zusammenhang zwischen der Erhöhung der Hyphendichte und der Fruchtkörperbildung steht im Einklang mit der Hypothese von Klebs (1900), die besagt,

daß das Wachstum eine Vorstufe der Fruchtkörperbildung und nur die längere Ernährungszeit der entscheidende Faktor ist.
Auch Hawker (1957) stellte fest, daß die Induktion der Fruchtkörperbildung nur dann stattfindet, wenn eine hohe Stoffwechselaktivität vorhanden ist.

Nachdem durch L-Arginin die Synthese der Zellwand stimuliert wird, wie die Erhöhung von Ausbreitungsgeschwindigkeit, Trockensubstanz und Hyphendichte zeigten, kann der Wirkungsmechanismus dieser Substanz auf die Syntheseleistungen des Pilzes wie folgt verstanden werden:
L-Arginin wird durch Arginase in Harnstoff und L-Ornithin gespaltet. L-Ornithin wird über L-Glutaminsäure-semialdehyd in L-Glutaminsäure überführt, aus der wiederum L-Asparaginsäure gebildet werden kann, die mit Carbamylphosphat Carbamyl-Aspartat ergibt und über Orotsäure zu Uridinphosphat metabolisiert wird. Damit wird die Pyrimidin-Synthese stimuliert. Natürlich kann L-Asparaginsäure auch über Transaminierung von Oxalessigsäure synthetisiert werden. Der abgespaltene Harnstoff wird durch Urease in CO_2 und NH_3 gespalten, woraus mit Hilfe der Carbamylphosphat-Synthetase Carbamylphosphat gebildet werden kann.
Aus L-Glutaminsäure wird über eine Transaminierungsreaktion L-Glutamin gebildet, das mit Fructose-6-Phosphat Glucosamin und nach einer Acetylierung mit Acetal Co-A N-Acetylglucosamin ergibt, wodurch die Bildung von Chitin und damit auch die Zellwand-Synthese entsprechend stimuliert wird.

Vorversuche zeigten, daß auf Fructose-Medium die Arginase-Aktivität durch L-Arginin auf das 20 fache gesteigert wird. Walk (in Vorbereitung) konnte nachweisen, daß die Ornithin-Transcarbamylase-Aktivität durch L-Arginin in vivo auf die Hälfte reduziert wird. Damit steht fest, daß der Harnstoffzyklus unter optimalen Bedingungen für die Fruchtkörperbildung nicht stimuliert wird. Im Gegenteil,

die vorläufigen Ergebnisse über die Arginase und Ornithin-Transcarbamylase-Aktivitäten weisen darauf hin, daß L-Arginin über L-Ornithin an L-Glutaminsäuresemialdehyd metabolisiert wird.
Um nun während der Perithezienbildung in den Hyphenspitzenregionen der Ascogone und Hüllhyphen ein ausreichendes Angebot an L-Arginin für die Zellwand-, Nucleinsäure- und Protein-Synthese zu erreichen, muß das L-Arginin möglichst rasch und in hoher Konzentration dorthin transportiert werden. Dies kann mit Hilfe von Vesikeln aus den oben schon erwähnten Gründen sehr effektiv erfüllt werden.

Bei Neurospora crassa konnten Weiss und Davis (1973), Weiss (1973) sowie Subramanian, Weiss und Davis (1973) zeigen, daß der Anteil an freiem Arginin im Cytoplasma etwa 5% beträgt, während der weitaus größte Teil (ca. 90%) der Aminosäure mit Ornithin zusammen in Vesikeln kompartimentiert ist. Aufgrund der geringen Konzentration von L-Arginin im Cytoplasma findet kein nennenswerter Katabolismus der Aminosäure statt, da das im Cytoplasma befindliche L-Arginin entweder für die Protein-Synthese verwendet oder in den Vesikeln gespeichert wird.
Eine ähnliche Kompartimentierung für Aminosäuren wurde von Wiemken und Nurse (1973) bei Saccharomyces cerevisiae für Phenylalanin nachgewiesen. In diesem Falle fungiert jedoch die Vakuole als intracelluläres Kompartiment.

Weiterhin kann auch der kompartimentierten Speicherung von L-Arginin bei der Sporenkeimung eine besondere Bedeutung eingeräumt werden.
Bei der Keimung von Ascosporen bei S. macrospora tritt fast der ganze Protoplast aus der Keimspore aus, dann erst erfolgt die Bildung der Keimhype. Dabei ist zu beobachten, daß schon 5-7 Kerne im Cytoplasma vorhanden sind. Daraus ergibt sich, daß während der Keimung die

Synthese von Nukleinsäuren stattfinden muß. Aus den oben schon erwähnten Gründen wäre somit auch für die Prozesse während der Sporenkeimung die Speicherung von L-Arginin in den Ascosporen ein Vorteil.

Schmit und Brody (1975) konnten bei einem Vergleich der freien Aminosäuren im Mycel und in den Konidien von Neurospora nachweisen, daß in den Konidien 50% der Aminosäuren in Form von Glutaminsäure und Glutamin vorliegen. Bei der Keimung verringert sich der Anteil an Glutaminsäure, während sich im gleichen Maße der Asparaginsäure-Anteil erhöht. Der von den Autoren favorisierte Stoffwechselweg würde dabei wie bei E. coli (Dover und Halpern 1972) 3 reduzierte Coenzyme ergeben.
Auch bei höheren Pflanzen wurde gezeigt, daß L-Arginin eine Reservestoff-Funktion erfüllen kann, da Steward (1963) nachweisen konnte, daß der Gehalt an Arginin bei Artischocken im Winter wesentlich höher liegt als im Frühjahr.

Ueber ähnliche Effekte von L-Arginin auf morphogenetische Prozesse wie bei S. macrospora berichteten Thinh und Griffiths (1974) bei heterotrophen Chlorella-Kulturen. Auch in diesem Fall kann durch den Zusatz von L-Arginin eine Beschleunigung des Entwicklungszyklus, der mit der Bildung von Autosporen beendet ist, beobachtet werden. Nachdem eine Erhöhung der RNA-Synthese dabei als erster meßbarer Effekt auftritt, wird die stimulierende Wirkung von L-Arginin als ein frühes Erreichen einer kritischen Zellgröße, in Abhängigkeit von der RNA-Synthese interpretiert. Dabei wird von den Autoren angenommen, daß L-Arginin in den Mechanismus, der die Zellteilung reguliert, eingreift.

Die verhältnismäßig geringe Konzentration von L-Arginin (1 mM) und die um 3 d längere Dauer des Entwicklungszyklus auf L-Arginin freiem Medium könnte auch auf einem "Startereffekt" der Aminosäure beruhen.

Die Wirkung von L-Arginin wird dabei auf den reduzierten Stickstoff-Anteil der Verbindung zurückgeführt. Aus den schon erwähnten Gründen stimuliert L-Arginin die Synthesen von Proteinen, Nucleinsäuren und der Zellwand. Da durch L-Arginin die Synthesen stimuliert werden, kann nun genügend Nitrat-Reduktase gebildet werden, so daß, nach Verbrauch des im Medium enthaltenen L-Arginins, ein ausreichender Anteil an reduziertem Stickstoff vom Pilz selbst synthetisiert wird und die Zufuhr von externem L-Arginin nicht mehr notwendig ist. Die zeitliche Verzögerung der Entwicklung auf L-Arginin freiem Medium ist darauf zurückzuführen, daß zuerst eine ausreichende Menge an L-Arginin synthetisiert werden muß, dann aufgrund des gebildeten L-Arginins die Syntheseraten des Pilzes so erhöht werden, daß die Bildung von Perithezien stattfinden kann. Daß unter diesen Umständen auch weniger Perithezien gebildet werden, könnte auf eine L-Arginin-Limitierung zurückzuführen sein.

Aus den Untersuchungen von Barthelmess, Curtis und Kaeser (1974) geht hervor, daß das Mycel von N. crassa etwa 5% mehr L-Arginin enthält, als dem für die Fruchtkörperbildung von S. macrospora optimalen Medium zugesetzt wird. Daraus ist zu schließen, daß bei S. macrospora in jedem Fall eine Biosynthese von L-Arginin stattfinden muß.

Auch bei anderen Pilzen wie z.B. bei Arthrobotrys oligospora wurde von Nordbring-Hertz (1968, 1973) beobachtet, daß durch Aminosäuren und Oligopeptide die Differenzierung von Fangorganen induziert werden kann, wenn das Nähr-Medium an Nährstoffen verarmt ist. Ebenso konnte Eger (1970 a, b) bei Pleurotus nachweisen, daß Aminosäuren und andere Stickstoff-Verbindungen wie Harnstoff die Primordienbildung stimulieren. In beiden Fällen war es jedoch nicht möglich, für 1 Substanz eine besonders hohe Effektivität nachzuweisen.

Auch an Neurospora crassa wurde von Dicker, Oulevey und Turian (1969) gezeigt, daß durch hydrolysiertes Kasein die Morphologie vom Wildtyp und von einigen Mutanten stark beeinträchtigt wird, indem die Konidienbildung oder Aenderungen der Pigmentierung stimuliert bzw. Verzweigungen des Mycels verändert werden. Eine Erklärung für diese Effekte wurde allerdings von den Autoren nicht gegeben.

Biotin:

Biotin ist für die Fruchtkörperbildung prinzipiell notwendig. Bei der Verwendung von Fructose als Kohlenhydrat-Quelle ermöglicht ausschließlich der Zusatz von Biotin die Weiterentwicklung von Protoperithezien zu Perithezien, während L-Arginin nur die Geschwindigkeit der Differenzierung reguliert. Dabei ist die Zahl der Fruchtkörper sowie die Bildung der Ascosporen und deren Pigmentierung eine Funktion der Biotin-Konzentration. Man kann davon ausgehen, daß S. macrospora K^+d unter diesen experimentellen Bedingungen entweder in der Lage ist, eine ausreichende Menge an Biotin zu synthetisieren, oder die verwendeten Reagenzien (z. B. Agar) geringste Spuren an Verunreinigungen enthalten, so daß ein vegetatives Wachstum möglich ist. Für K^+h hingegen ist anzunehmen, daß der Stamm entweder mehr Biotin produzieren kann als K^+d, oder aber die in den Reagenzien enthaltenen Spuren an Biotin genügen, um die Bildung von einigen Perithezien mit defekten Asci zu erlauben.

Die Bedeutung von Biotin bzw. Biotin und Thiamin für die sexuelle Reproduktion bei einer verwandten Art von S. macrospora, nämlich bei S. fimicola, wurde schon von Barnett und Lilly (1947 a, b) beschrieben. Bei S. fimicola wird jedoch die Ascogon-Bildung durch Biotin kontrolliert. Auch bei Neurospora crassa wurde gezeigt (West 1975), daß Biotin für morphogenetische Prozesse erforderlich ist, da durch Biotin-Mangel eine rhythmische Konidienbildung

induziert wird. Außerdem konnten Aurich, Neumann und Kleber (1967) bei Neurospora zeigen, daß durch Biotin-Mangel eine Reduktion des DNA-, RNA- und Protein-Gehalts im Mycel hervorgerufen wird.

In diesem Zusammenhang erscheint der Bericht von Wellner, Santos und Meister (1968) sehr bemerkenswert, da die Autoren nachweisen konnten, daß Biotin als prosthetische Gruppe der Carbamylphosphat-Synthetase fungiert. Dieser Befund wurde zwar inzwischen durch die Ergebnisse von Huston und Cohen (1969) sowie Peng und Jones (1969) in Frage gestellt, da diese Autoren nachweisen konnten, daß durch Avidin die Aktivität der Carbamylphosphat-Synthetase nicht beeinträchtigt wird. Daraus ist allerdings nur zu schließen, daß Biotin nicht als prosthetische Gruppe dieses Enzyms wirkt. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, daß Biotin z. B. die Bildung dieses Enzyms stimuliert. Ravel, Grona, Humphrey und Shive (1959) berichteten bei Streptococcus lactis, daß Biotin für die Synthese der Ornithin-Transcarbamylase notwendig ist, aber die Enzym-Aktivität selbst nicht durch Avidin zu hemmen ist. Gleiches wurde bei S. macrospora von Walk (in Vorbereitung) nachgewiesen. Nachdem Carbamylphosphat für die Pyrimidin-Synthese erforderlich ist, könnte durch Biotin-Mangel eine Limitierung der Nucleinsäure-Synthese hervorgerufen werden, wie das bei N. crassa von Aurich, Neumann und Kleber (1967) sowie bei Ratten-Leber von Dakshinamurti und Litvak (1970) gezeigt werden konnte. Die weiteren Untersuchungen von Boeckx (1974) sowie Boeckx und Dakshinamurti (1975) zeigten, daß Biotin die RNA-Synthese beeinflußt, da nach einer Biotin-Injektion in Biotin defiziente Ratten der Einbau von Vorstufen (Orotsäure) in die Kern-DNA auf mehr als das Doppelte erhöht wird. Dieser sowohl in vivo als auch in vitro beobachtete Einbau ist etwa 2 h nach der Injektion schon nachzuweisen. Dabei existieren Hinweise dafür, daß in vivo Biotin in die Kerne transportiert wird. Außerdem wurde nachgewiesen, daß durch

Biotin-Injektionen eine differentielle Synthese von RNA- und Proteinen stimuliert wird. Aufgrund dieser Berichte kann man annehmen, daß Biotin die RNA-Synthese beeinflußt. Daher kommt den Experimenten mit Inhibitoren der RNA-Synthese eine besondere Bedeutung zu.

Bei S. macrospora wird die Bildung der Fruchtkörper durch 5-F.U., einem Hemmstoff der RNA- und DNA-Synthese, selektiv blockiert. Erfolgt die Applikation des Inhibitors jedoch erst nach 3-tägiger Inkubation des Mycels unter optimalen Bedingungen (Fructose-Medium II), so kann der Ablauf der Entwicklung weder verzögert noch gehemmt werden. Dabei ist auszuschließen, daß die Aufnahme von 5-F.U. nach 72 h blockiert ist, da die Differenzierung von Perithezien durch Inokulation auf 5-F.U.-Medium blockiert wird, selbst wenn eine 1-tägige Inkubation auf 5-F.U. freiem Medium dazwischen geschaltet ist. Daraus ergibt sich, daß die für die sexuelle Reproduktion verantwortlichen Regulationsvorgänge nach weniger als 72 h Inkubation unter optimalen Bedingungen durch 5-F.U. nicht mehr zu hemmen sind. Aus den reziproken 5-F.U.-Versuchen geht hervor, daß durch eine längere Vorinkubation auf 5-F.U.-Medium (mindestens 3 d) nur mehr 48 h ohne 5-F.U. notwendig sind, um einen irreversiblen Ablauf der Fruchtkörperbildung zu induzieren.

Weitere Experimente sollen zeigen, ob dies auf einen Abbau von 5-F.U. zurückzuführen ist. Dabei erscheint der Abbau des Inhibitors nicht als wahrscheinlich, da auch nach längerer Inkubation auf 5-F.U. (36 d) keine Perithezienbildung auftritt.

Galun und Gressel (1966) konnten an Trichoderma viride zeigen, daß durch 5-F.U. ebenso wie bei S. macrospora die selektive Hemmung eines morphogenetischen Prozesses möglich ist, ohne dabei das Wachstum zu beeinträchtigen.

Auch bei S. fimicola wiesen Lindenmayer und Schoen (1965) nach, daß die Bildung von Fruchtkörpern durch Basenanaloga wie 5-Fluoruracil, 6-Azauracil, 8-Azaguanin oder 8-Azaadenin selektiv gehemmt werden kann, ohne dabei das vegetative Wachstum zu beeinflussen. Dagegen war es nicht möglich, die Initiation der Perithezienbildung durch Inhibitoren der RNA- und Protein-Synthese wie z.B. Actinomycin D, Puromycin oder Cycloheximid selektiv zu blockieren.

Die Selektivität der 5-F.U.-Hemmung läßt Vermutungen auf den betroffenen Bereich zu: Bei Hefen wird die Synthese der ribosomalen RNA durch 5-F.U. wesentlich mehr gehemmt als die der löslichen und messenger RNA (de Kloet und Strijkert 1966). Außerdem werden durch die 5-F.U.-Behandlung kleinere Ribosomen gebildet, die Proteinsynthese gehemmt und infolge dessen auch die Konzentration an freien Aminosäuren erhöht (Kempner und Miller (1963).

Auch bei höheren Pflanzen wie z.B. bei Sojabohnen und Xanthium wurde nachgewiesen, daß durch 5-F.U. die Synthese der ribosomalen und löslichen RNA sowie der DNA inhibiert wird, nicht jedoch die der messenger-RNA (Cherry und Huystee 1965, Keyl 1966).

Bisher ist allerdings noch ungeklärt, warum die Wirkung von Biotin auf die Fruchtkörperbildung durch den Zusatz von Avidin nicht aufgehoben wird. Dabei kann ausgeschlossen werden, daß der Biotin-Avidin-Komplex durch die Zugabe zum Nähr-Medium (5 min) denaturiert wird, da er bis 90°C stabil ist (Knappe 1960). Eine andere Möglichkeit wäre die Spaltung des Komplexes durch proteolytische Exo-Enzyme des Pilzes. Allerdings erscheint diese Möglichkeit aufgrund der Ergebnisse von Drucker (1965) über Exoproteasen bei N. crassa als unwahrscheinlich, da für eine derartige Induktion sowohl ein Protein-Substrat, als auch eine aktivierende Protease mit spezi-

fischen Eigenschaften zur gleichen Zeit vorhanden sein muß. Selbst wenn diese Bedingungen erfüllt würden, müßte man eine zeitliche Verzögerung der Fruchtkörperbildung durch den Zusatz von Avidin erwarten, da ja die Enzyme erst stimuliert werden müßten. Die experimentellen Befunde schließen dies jedoch vollständig aus.

Weitere Versuche sollen klären, ob durch eine Inaktivierung von Biotin, z.B. durch Antikörper, die Fruchtkörperbildung von S. macrospora nicht zu hemmen ist.

Zwischen den beiden Substanzen treten ohne Zweifel Wechselwirkungen auf, wie das die Ergebnisse der Optimierungs-Experimente, der nicht lineare Verlauf der Ausbreitungsgeschwindigkeiten auf dem Fructose-Medium II ohne Biotin (aber mit L-Arginin) bzw. mit Biotin aber ohne L-Arginin sowie die Erniedrigung der Fruchtkörperzahl und die Induktion der Pigmentierung durch suboptimale Biotin-Konzentrationen bei optimaler L-Arginin-Konzentration zeigen.

Der Wirkungsmechanismus von Biotin bezüglich der Fruchtkörperbildung von S. macrospora ist noch ungeklärt. Es kann jedoch aufgrund der geringen Konzentration von Biotin (24 nM) angenommen werden, daß Biotin eine katalytische Wirkung in Form einer Enzyminduktion hervorruft. Die Versuche mit Avidin lassen vermuten, daß Biotin dabei nicht als prosthetische Gruppe fungiert.

Die Wirkungen der Inhibitoren, Temperatur und 5-F.U. auf die Fruchtkörperbildung von S. macrospora zeigen, daß die Hemmechanismen der beiden Faktoren unterschiedlicher Natur sind. Dabei kann man davon ausgehen, daß es sich bei 5-F.U. um einen für die Fruchtkörperbildung spezifischen Inhibitor handelt, während durch die erhöhte Temperatur viele Stoffwechselreaktionen beeinflußt werden und die konstante Verlängerung des Entwicklungszyklus um 4, 5 oder 6 d darauf zurückzuführen ist.

Wie aus den Versuchen mit 5-F.U. hervorgeht, ist es möglich, mit diesem Hemmstoff eine für die Fruchtkörperbildung spezifische Phase unter verschiedenen Bedingungen (Anzucht auf 5-F.U. oder auf Fructose-Medium) zu lokalisieren, was für die weitere Charakterisierung dieser Regulation einen großen Vorteil darstellt.

Außerdem geht aus den Ergebnissen der Myceltrockengewichtsbestimmungen sowie der Nähr-Boden-Gradienten hervor, daß bei S. macrospora die Verarmung des Mediums an Nährstoffen nicht der induzierende Anstoß für die sexuelle Reproduktion sein kann, da sowohl das Trockengewicht als auch die Bildung der Fruchtkörper zur gleichen Zeit das Maximum erreichen, die Fruktifikation außerdem im Bereich des größten Nährstoffangebots am größten ist und die Perithecien in allen Bereichen des Gradienten zur gleichen Zeit gebildet werden.
Diese Befunde stehen im Gegensatz zu den Verhältnissen bei Aspergillus nidulans, wo Zonneveld (1972) nachweisen konnte, daß die Fruktifikation erst nach Verbrauch der im Medium enthaltenen Glucose initiiert wird, so daß das Maximum der Trockensubstanz schon nach 3-4 d erreicht, die Cleistothecien-Bildung jedoch erst nach 7 d abgeschlossen ist. Dabei wird α-1,3-Glucan gespeichert, das nach Verbrauch der Glucose im Medium durch α-1,4-Glucanase abgebaut wird und als Kohlenstoff- und Energie-Quelle dient.

Ein Vergleich der Ergebnisse von morphogenetischen Untersuchungen an einigen Vertretern der Sordariaceen zeigt, daß einige Übereinstimmungen zu finden sind, so daß für diese Familie sehr ähnliche Regulationssysteme gefordert werden können:

1.) Für die meisten entwicklungsphysiologischen Untersuchungen an Neurospora wurde das synthetische Medium von Westergaard und Hirsch (1954) verwendet, das 5 µg/l Biotin enthält. Gleiches gilt für Podospora anserina (Esser 1956 b). Auch die Experimente an Sordaria fimicola (Lindenmayer und Schoen 1967, Barnett und Lilly 1947 a, b) wurden auf Biotin-haltigen Medien durchgeführt, so daß man annehmen kann, daß für die Fruchtkörperbildung generell Biotin notwendig ist. Die Bedeutung von Biotin für die Differenzierung von S. fimicola wurde schon von Barnett und Lilly (1947 a, b) hervorgehoben, allerdings wird bei diesem Organismus die Ascogon-Bildung durch Biotin reguliert.

2.) Der Ablauf des Entwicklungszyklus beträgt sowohl bei S. fimicola als auch bei Neurospora ungefähr 10 d. Dies stimmt mit der Dauer der Differenzierung von S. macrospora überein, wenn die Inkubation auf einem Biotin-haltigen Medium ohne L-Arginin erfolgt. Bei Neurospora sind bisher noch keine Berichte über eine Erhöhung der Entwicklungsgeschwindigkeit durch Aminosäuren bekannt.

3.) Eine reversible Hemmung der Morphogenese durch erhöhte Temperatur ist sowohl bei N. crassa (Hirsch 1954, Westergaard und Hirsch 1954), N. tetrasperma (Viswanath-Reddy und Turian 1972, 1975) als auch bei S. macrospora möglich. Allerdings ist die Dauer der sensitiven Phase bei Neurospora wesentlich kürzer, was wohl auf die beträchtlich höhere Wachstumsgeschwindigkeit dieses Pilzes zurückzuführen ist.

4.) Die Ergebnisse von Neurospora über die Reduktion des DNA-, RNA- und Protein-Gehalts im Mycel durch Biotin-Mangel (Aurich, Neumann und Kleber 1967) sowie die Verringerung der RNA-Synthese bei einer Hemmung der Differenzierung durch erhöhte Temperatur

(Viswanath-Reddy und Turian 1972, 1975) und die selektive Blockierung der Fruchtkörperbildung durch den RNA-Inhibitor 5-F.U. bei S. fimicola (Lindenmayer und Schoen 1967) sind mit den Resultaten bei S. macrospora über die Biotin-abhängige Fruchtkörperbildung und die durch erhöhte Temperatur oder Inkubation mit 5-F.U. erzielte selektive Hemmung der Differenzierung zwanglos in Einklang zu bringen.

Inwieweit Hormone eine Rolle bei der Regulation der Morphogenese von Ascomyceten spielen ist bisher noch nicht geklärt. Es existieren zwar viele Berichte, die eine Wirkung derartiger Substanzen fordern, die Charakterisierung dieser Substanzen steht bis heute jedoch noch aus (Bistis 1956, 1957, Islam und Weijer 1972, Islam 1973, Vigfusson und Cano 1974, Gooday 1974). Ohne Zweifel läßt auch das gerichtete Wachstum der Hüllhyphen auf eine hormonelle Wirkung schließen. Gleiches gilt für die postulierten Sperrmechanismen, die verhindern, daß von 2 benachbarten Ascogonen nur eines zu einem Protoperithezium differenzieren kann, während das andere Protoperithezium und die bereits angelegten Hüllhyphen zu vegetativen Hyphen redifferenzieren.

Sordaria macrospora besitzt äußerst günstige Voraussetzungen,um den Wirkungsmechanismus der Fruchtkörperinduktion zu erforschen, da das Problem von der cytologischen, biochemischen und genetischen Seite in Angriff genommen werden kann. Sowohl durch die Verwendung von Defektmutanten (Esser und Straub 1958) als auch durch Veränderungen des Nährmediums können sämtliche morphogenetischen Stadien blockiert werden; umgekehrt lassen sich bestimmte genetische Blockierungen im Entwicklungszyklus durch geeignete Nähr-Medien zumindest teilweise kompensieren.

Die Tatsache, daß bei einem physiologisch und genetisch definierten System durch die Zugabe einer Substanz (Biotin) die Differenzierung von Perithezien induziert werden kann, außerdem durch die Zugabe einer anderen Substanz (L-Arginin) die Fruchtkörperbildung um 45% erhöht und 5% beschleunigt wird, berechtigt zu der Hoffnung, die wichtigsten kausalen Zusammenhänge bei einem entscheidenden morphogenetischen Prozeß aufzuklären.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Als Beispiel für die Steuerung eines morphogenetischen Prozesses bei den Pilzen wurde die Fruchtkörperbildung des Ascomyceten Sordaria macrospora untersucht. Um die Einflüsse der externen Faktoren auf die sexuelle Reproduktion erfassen zu können, wurden exakt definierte Bedingungen ermittelt, die einen optimalen Ablauf des Entwicklungszyklus ermöglichen. Dabei wurden folgende Ergebnisse gefunden:

1.) Für den vollständigen Ablauf des Entwicklungszyklus sind 5 Faktoren unbedingt notwendig.
2.) Die Fruchtkörperbildung wird von den beiden Faktoren L-Arginin und Biotin spezifisch kontrolliert.
3.) Bei Verwendung von Stärke als Kohlenhydrat-Quelle kann die Bildung von Perithezien in Anwesenheit von Biotin nur durch L-Arginin induziert werden.
4.) Wird Fructose als Kohlenhydrat-Quelle verwendet, so bewirkt L-Arginin nur eine Beschleunigung der Entwicklung um 33% sowie eine Erhöhung der Peritheziendichte um 45%. Auch andere Stickstoff-Verbindungen wie z.B. Aminosäuren oder Ammoniumsalze können die Perithezienbildung um maximal 20% beschleunigen bzw. die Peritheziendichte um maximal 16% erhöhen.
5.) L-Arginin bewirkt unabhängig von Biotin eine Erhöhung der Ausbreitungsgeschwindigkeit des Mycels.
6.) Für den vollständigen Ablauf der Differenzierung ist Biotin prinzipiell notwendig.
7.) Die Mycelmasse, die Zahl der Perithezien sowie die Differenzierung der Ascosporen sind eine Funktion der Biotin-Konzentration.
8.) Die Aufnahmegeschwindigkeit von L-Arginin wird durch Biotin in Abhängigkeit von L-Arginin um 1 bzw. 2 Zehnerpotenzen erhöht.

9.) Das Ueberschreiten einer kritischen Hyphendichte ist für die sexuelle Reproduktion eine notwendige, aber keine hinreichende Bedingung.

10.) Durch das Basenanalogon 5-Fluoruracil kann die Fruchtkörperbildung selektiv blockiert werden. Dabei wurde eine sensitive Phase für die Induktion der Perithezienbildung gefunden.

11.) Ebenso konnte gezeigt werden, daß auch eine Inkubation bei erhöhter Temperatur die sexuelle Reproduktion hemmt.

12.) Es wurde nachgewiesen, daß bei S. macrospora nicht die Erschöpfung der Nährstoffe der induzierende Anstoß für die Bildung von Perithezien ist.

13.) Ein ursächlicher Zusammenhang zwischen der Melanin-Produktion und der Fruchtkörperbildung konnte ausgeschlossen werden.

14.) Es zeigte sich, daß die Mycelmasse trotz einer Verringerung der Fruchtkörper konstant bleiben kann und somit keine Korrelation zwischen der Peritheziendichte und der Mycelmasse bestehen muß.

15.) Für die quantitative Bestimmung der Fruchtkörperbildung wurde eine Methode entwickelt, die es gestattet, mit einem automatischen Bildanalysator die Perithezienzahl exakt und rasch zu erfassen.

16.) Außerdem wurde ein digitales Steuergerät für kinematographische Aufnahmen entwickelt, das Untersuchungen von empfindlichen biologischen Objekten bei hoher Temperatur-Konstanz und minimalen Licht-Einflüssen gestattet und eine exakte Auswertung des Filmmaterials ermöglicht.

6. LITERATUR

Aurich, H., Neumann, W., Kleber, H.-P.: Nucleinsäuren und Proteine im Biotin- und Pyridoxinmangel bei Neurospora. Acta Biol. Med. Ger. 19, 221-229 (1967)

Austin, D.J., Bu Lock, J.D.; Gooday, G.W.: Trisporic acids: Sexual hormones from Mucor mucedo and Blakeslea trispora. Nature 223, 1178-1179 (1969)

Baker, G.E., Ware, B.: Induction of perithecial primordia in Hypomyces solani f. cucurbitae. Phytopathology 52, 359 (1962)

Barbesgaard, P., Wagner, S.: Further studies on the biochemical basis of protoperithecia formation in Neurospora crassa. Hereditas 45, 564-572 (1959)

Barnett, H.L., Lilly, V.G.: The effects of biotin upon the formation and development of perithecia, asci and ascospores by Sordaria fimicola Ces. and de Not. Am. J. Botany 34, 196-204 (1947 a)

Barnett, H.L., Lilly, V.G.: The relation of thiamine to the production of perithecia by Ceratostomella fimbriata. Mycologia 39, 699-708 (1947 b)

Barthelmess, I.B., Curtis, C.F., Kaeser, H.: Control of flux to Arginine in Neurospora crassa: De-repression of the last three enzymes of the Arginine-pathway. J. Mol. Biol. 87, 303-316 (1974)

Basu, S.N.: Significance of calcium in the fruiting of Chaetomium species, particulary Chaetomium globosum. J. Gen. Microbiol. 5, 231-238 (1951)

Berquist, R.R., Lorbeer, J.W.: Apothecial production, compatibility and sex in Botryotina squamosa. Mycologia 64, 1270-1281 (1972)

Bistis, G.N.: Sexuality in Ascobolus stercorarius I. Morphology of the ascogonium; plasmogamy; evidence for a sexual hormonal mechanism. Am. J. Bot. 43, 389-394 (1956)

Bistis, G.N.: Sexuality in Ascobolus stercorarius II. Preliminary experiments on various aspects of the sexual process. Am. J. Bot. 44, 436-443 (1957)

Boeckx, R.L.: Biotin-mediated protein biosynthesis. Biochem. J. 140, 549-556 (1974)

Boeckx, R.L., Dakshinamurti, K.: Effect of Biotin on Ribonucleic acid synthesis. Biochim. Biophys. Acta 383, 282-289 (1975)

Bonner, J.T.: Aggregation and differentiation in the cellular slime moulds. Ann. Rec. Microbiology 25, 75-92 (1971)

Bretzloff, C.W., Jr.: The growth and fruiting of Sordaria fimicola. Am. J. Bot. 41, 58-67 (1954)

Buddecke, E.: Grundriß der Biochemie. Walter de Gruyter & Co., Berlin (1971)

Buston, H.W., Rickard, B.: The effect of physical barrier on sporulation of Chaetomium globosum. J. Gen. Microbiol. 15, 194-197 (1956)

Campbell, R.N.: Nutrient requirements for the production of perithecia by Ceratocystis variospora and other species. Am. J. Botany 45, 263-270 (1958)

Campbell, R.N.: Effects of nitrogen and calcium on perithecial formation by Ceratocystis fimbriata. Phytopathology 50, 631 (1960)

Cantino, E.C., Lovett, J.S.: Non-filamentous aquatic fungi: Modelsystem for biochemical studies of morphological differentiation. In: M. Abercrombie, J. Brachet (eds.). Advances in Morphogenesis. 3, 33-93. Academic Press, New York (1964)

Carr, A.J.H., Olive, L.S.: Genetics of Sordaria fimicola III. Cross-compatibility among self-fertile and self-sterile cultures. Amer. J. Bot. 46, 81-91 (1959)

Cherry, J.H.; van Huystee, R. : Effects of 5-Fluoruracil on photoperiodic induction and nucleic acid metabolism of Xanthium. Plant Physiol. 40, 987-993 (1965)

Dakshinamurti, K., Litvak, S.: Biotin and protein synthesis in rat liver. J. Biol. Chem. 245, 5600-5605 (1970)

Dangeard, P.A.: Recherches sur le development du perithèce chez les ascomycetes. Botaniste 9-10 (1903/07)

Davidsson, M., Unestram, T.: Factors affecting the sexual reproduction of a dermatophyte, Arthroderma benhamiae, in synthetic media. Physiol. Plant. 31, 237-244 (1974)

De Busk, G.G., De Busk, A.G.: Molecular transport in Neurospora crassa. Properties of a phenylalanin permease. Biochim. Biophys. Acta 104, 139-150 (1965)

Dengler, I.: Entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen an Sordaria macrospora Auersw., S. uvicola Viala et Mars. und S. Brefeldii Zopf. Jb. wiss. Bot. 84, 427-448 (1937)

Dicker, J.W., Oulevey, N., Turian, G.: Amino acid induction of conidiation and morphological alterations in wild type and morphological mutants of Neurospora crassa. Arch. Mikrobiol. 65, 241-157 (1969)

Dover, S.Y., Halpern, S.: Utilization of δ-aminobutyric acid as the sole carbon and nitrogen source by Escherichia coli K-12 mutants. J. Bacteriol. 109, 144-151 (1972)

Drucker, H.: Regulation of exocellular proteases in Neurospora crassa: Metabolic requirements of the process. J. Bacteriol. 122, 1117-1125 (1975)

Duntze, W.; Machay, N., Manney, T.R.: Saccharomyces cerevisiae. A diffusible sex factor. Science 168, 1472-1473 (1970)

Duntze, W., Stötzler, D., Bücking-Throm, E., Kalbitzer, S.: Purification and partial characterisation of α-factor, a mating type specific inhibitor of cell reproduction from Saccharomyces cerevisiae. Eur. J. Biochem. 35, 357-365 (1973)

Eger, G.: Die Wirkung einiger N-Verbindungen auf Mycelwachstum und Primordienbildung des Basidiomyceten Pleurotus spec. aus Florida. Arch. Mikrobiol. 74, 160-173 (1970 a)

Eger, G.: Die Wirkung des Lichts auf die Primordienbildung des Basidiomyceten Pleurotus spec. aus Florida. Arch. Mikrobiol. 74, 174-192 (1970 b)

Elliot, C.G.: Effects of inhibitors of sterol synthesis on growth of Sordaria and Phytophthora. J. Gen. Microbiol. 56, 331-343 (1969)

Esser, K.: Gen Mutanten von Podospora anserina (Ces.) Rehm mit männlichem Verhalten. Naturwissenschaften 43, 284 (1956 a)

Esser, K.: Wachstum, Fruchtkörper- und Pigmentbildung von Podospora anserina in synthetischen Nährmedien. Compt. rend. Lab. Carlsberg Ser. Physiolog. 26, 103-116 (1956 b)

Esser, K., Straub, J.: Fertilität im Heterocaryon aus zwei sterilen Mutanten von Sordaria macrospora Auersw. Z. indukt. Abstamm. - u. Vererb. - L. 87, 625-626 (1956)

Esser, K., Straub, J.: Genetische Untersuchungen an Sordaria macrospora Auersw., Kompensation und Induktion bei genbedingten Entwicklungsdefekten. Z. Vererbungslehre 89, 729-746 (1958)

Esser, K.; Kuenen, R.: Genetik der Pilze. Springer, Berlin, Heidelberg, New York (1965)

Esser, K.: Phenoloxidases and morphogenesis in Podospora anserina. Genetics 60, 281-288 (1968)

Faro, S.: Physiological aspects of pigment production in relation to morphogenesis in Panus tigrinus. Mycologia 64, 375-387 (1972)

Fukuda, Y., Inoue, Y., Furuya, M.: Developmental anatomy of experimentally induced ascocarps in Gelasinospora reticulispora. Bot. Mag. Tokyo 84, 339-348 (1971)

Galun, E., Gressel, J.: Morphogenesis in Trichoderma: Suppression of photoinduction by 5-Fluoruracil. Science 151, 696-698 (1966)

Gooday, G.W.: The extraction of a sexual hormone from the mycelium of Mucor mucedo. Phytochemistry 7, 2103-2105 (1968)

Gooday, G.W.: Fungal sex hormones. Ann. Rev. Biochem. 43, 35-49 (1974)

Hall, R.: Effect of carbon-nitrogen ratios on production of perithecia by Sordaria fimicola. Can. J. Microbiol. 17, 132-134 (1971)

Hawker, L.E.: The influence of various sources of carbon on the formation of perithecia by Melanospora destruens. Shear in the presence of accessory growth factors. Ann. Bot. (London) 3, 455-468 (1939)

Hawker, L.E.: Effect of vitamin B_1 on concentration of glucose optimal for certain fungi. Ann. Botany (London) (N.S.) 6, 631-636 (1942)

Hawker, L.E.: Stimulation of the formation of perithecia of Melanospora destruens. Shear by small quantities of certain phosphoric esters of glucose and fructose. Ann. Botany (London) (N.S.) 12, 77-79 (1948)

Hawker, L.E.: The physiology of reproduction in fungi. Cambridge Univ. Press, London and New York (1957)

Heunert, H.H.: Präparationsmethoden für Vitalbeobachtungen an Mikroorganismen. Zeiss. Inform. 81, 40-49 (1973)

Hirsch, H.M.: Environmental factors influencing the differentiation of protoperithecia and their relation to tyrosinase and melanin formation in Neurospora crassa. Physiol. Plantarum 35, 757-766 (1954)

Hix, S.M., Baker, R.: Physiology of sexual reproduction in Hypomyces solani f. cucurbitae. I. Influence of carbon and nitrogen. Phytopathology 54, 584-586 (1964)

Hogenson, R., Hosford, R.M.: Sexual reproduction in Leptosphaeria avenaria f. sp. triticea induced by wave lengths of light greater than 560 nm. Mycologia 63, 958-963 (1971)

Horowitz, N.H., Fling, M., Mac Leod, H.L., Sueoka, N.: Genetic determination and enzymatic induction of tyrosinase in Neurospora. J. Mol. Biol. 2, 96-104 (1960)

Huston, R.B., Cohen, P.P.: On the reported presence of biotin in carbamylphosphate synthetase. Biochemistry 7, 2848 (1969)

Inoue, Y., Furuya, M.: Perithecial formation in Gelasinospora reticulispora. I. Effects of light at two different growth states. Development, Growth and Differentiation 12, 141-150 (1970)

Inoue, Y., Furuya, M.: Perithecial formation in Gelasinospora reticulispora. II. Promotive effects of near-ultraviolet and blue light after dark incubation. Plant and Cell Physiol. 15, 195-204 (1974 a)

Inoue, Y., Furuya, M.: Perithecial formation in Gelasinospora reticulispora. III. Inhibitory effects of near-UV and blue light during the inductive dark period. Plant and Cell Physiol. 15, 469-475 (1974 b)

Islam, M.S., Weijer, J.: Development of fertile fruit bodies in a single-strain culture of Neurospora crassa. Folia Microbiol. 17, 316-319 (1972)

Islam, M.S.: Sex-hormones in Neurospora crassa further studies on its biological properties. Mycopath, Mycol. appl. 51, 87-97 (1973)

Karlson, P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1971)

Kempner, E.S., Miller, E.S.: The mechanism of action on purine and pyrimidine analogs in microorganisms. Biochim. Biophys. Acta 76, 341-346 (1963)

Keyl, J.L.: Effect of purine and pyrimidine analogs on growth and RNA metabolism in the soybean hypocotyl - the selective action of 5-F.U.. Plant Physiol. 41, 1257-1264 (1966)

Knappe, J.: Mechanism of biotin action. Ann. Rev. Biochem. 39, 757-776 (1970)

Klebs, G.: Zur Physiologie der Fortpflanzung einiger Pilze. III. Allgemeine Betrachtungen. Jahrb. wiss. Bot. 35, 80-203 (1900)

de Kloet, S.R., Strijkert, P.J.: Selektive inhibition of ribosomal RNA-synthesis in Saccharomyces carlsbergensis by 5-Fluoruracil. Biochem. Biophys. Res. Commun. 23, 49-55 (1966)

Lausberg, K.M.: Studien über die Fruchtkörperentwicklung bei den Sordariaceen. Staatsexamensarbeit, Köln (1957)

Leisinger, T., Haas, D., Hegarty, M.P.: Indospicine as an antagonist in Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa. Biochim. Biophys. Acta 262, 214-219 (1972)

Leisinger, T., O'Sullivan, C., Haas, D.: Effect on growth and on the first two enzymes of the arginine pathway in Pseudomonas aeruginosa. J. Gen. Microbiol. 84, 253-260 (1974)

Leonard, T.J.: Phenoloxidase activity and fruitbody formation in Schizophyllum commune. J. Bacteriol. 106, 162-167 (1971)

Leonard, T.J., Phillips, L.E.: Study of phenoloxidase activity during the reproductive cycle in Schizophyllum commune. J. Bacteriol. 114, 7-10 (1973)

Lilly, V.G., Barnett, H.L.: The influence of pH and certain growth factors on the mycelial growth and perithecial formation of Sordaria fimicola. Am. J. Bot. 34, 131-138 (1947)

Lilly, V.G., Barnett, H.L.: The influence of concentrations of nutrients, thiamine and biotin upon growth and formation of perithecia and ascospores by Chaetomium convolutum. Mycologia, 41, 186-196 (1949)

Lindenmayer, A., Schoen, H.F.: Selektive effects of purine and pyrimidine analogues and of respiratory inhibitors on perithecial development and branching in Sordaria. Plant Physiol. 42, 1059-1070 (1967)

Linder, A.: Planen und Auswerten von Versuchen. Birkhäuser Verlag, Basel und Stuttgart (1969)

Machlis, L.: Evidence for a sexual hormone in Allomyces. Physiol. Pl. 11, 181-192 (1958 a)

Machlis, L.: A procedure for the purification of Sirenin. Nature 181, 1790-1791 (1958 b)

Machlis, L., Williams, M.W.; Rapoport, H.: Production, isolation and characterisation of Sirenin. Biochemistry 5, 2147-2152 (1966)

Machlis, L., Nutting, W.H., Rapoport, H.: The structure of Sirenin. J. Am. Chem. Soc. 90, 1674-1676 (1968)

Machlis, L.: The coming of age of sex hormones in plants. Mycologia, 64, 235-245 (1972)

Marukawa, S., Funakawa, S., Satomura, Y.: Role of sclerin on morphogenesis in Sclerotinia sclerotiorum de Bary (including S. libertiana Fuckel). Agr. Biol. Chem. 39, 645-650 (1975)

Massey, L.K., Clark, J.B.: Changes in RNA transcription during morphogenesis of Arthrobacter crystallopoietes. J. Gen. Microbiol. 77, 51-60 (1973)

Mc Gahen, J.W., Wheeler, H.E.: Genetics of Glomerella. IX. Perithecial development and plasmogamy. Am. J. Bot. 38, 610-167 (1951)

Mc Morris, T.C., Barksdale, A.W.: Isolation of a sex hormone from the water mould Achlya ambisexualis. Nature, (London), 215, 320-321 (1967)

Metzner, M.: Biochemie der Pflanzen. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart (1973)

Mohr, H., Sitte, P.: Molekulare Grundlagen der Entwicklung. BVL, München, Bern, Wien (1971)

Molowitz, R.: Die Induktion der Fruchtkörperbildung bei Sordaria macrospora, Staatsexamensarbeit, Ruhr-Universität Bochum 1975

Moore-Landecker, E., Stotzky, G.: Morphological abnormalities of fungi induced by volatile microbial metabolites. Mycologia, 65, 519-530 (1973)

Nasrallah, J.B., Srb, A.M.: Genetically related protein variants specifically associated with fruiting body maturation in Neurospora. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 70, 1891-1893 (1973)

Nordbring-Hertz, B.: The influences of medium composition and additions of animal origin on the formation of capture organs in Arthrobotrys oligospora. Ibid. 26, 279-284 (1968)

Nordbring-Hertz, B.: Peptide-induced morphogenesis in the nematode-trapping fungus Arthrobotrys oligospora. Physiol. Plant. 29, 223-233 (1973)

Nutting, W.H., Rapoport, H., Machlis, L.: The structure of Sirenin. J. Am. Chem. Soc. 90, 6434-6438 (1968)

Olive, L.S.: On the evolution of heterothalism in fungi. Am. Naturalist 42, 233-251 (1958)

Olive, L.S.: Sordaria. In: R.C. King (ed.). Handbook of Genetics. I 553-561 Plenum Press, New York, London (1974)

Pall, M.L.: Amino acid transport in Neurospora crassa. III. Acidic amino acid transport. Biochim. Biophys. Acta 211, 513-520 (1970)

Peng, L., Jones, M.E.: Effect of avidin on vertebrate carbamyl phosphate synthetase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 34, 335-339 (1969)

Pollock, R.T.: Environmental factors affecting the pattern of perithecium development in Sordaria fimicola on agar medium. Bull. Torrey Bot. Club 100, 78-83 (1973)

Quay, St., Christensen, H.N.: Basis of transport discrimination of arginine from other basic amino acids in Salmonella typhimurium. J. Biol. Chem. 21, 7011-7017 (1974)

Qureshi, A.A., Page, O.T.: Observations on morphological and nutrional aspects of perithecial formation of Nectria haematococca and Hypomyces solani. Can. J. Botany, 50, 2443-2448 (1972)

Raper, J.R., Haagen-Smit, A.J.: Sexual hormones in Achlya. IV. Properties of Hormone and of Achlya ambisexualis. J. Biol. Chem. 143, 311-320 (1942)

Raper, J.R.: Sexualhormones in Achlya. Amer. Sci. 39, 110-120 (1951)

Raper, J.R.: Chemical regulation of sexual processes in the Thallophytes. Bot. Rev. 18, 447-545 (1952)

Raper, J.R.: The control of sex in fungi. Am. J. Bot. 47, 794-808 (1960)

Ravel, J.M., Grona, M.L., Humphrey, J.S., Shive, W.: Properties and biotin content of purified preparations of the ornithine-citrulline enzyme of Streptococcus lactis. J. Biol. Chem. 234, 1452-1455 (1959)

Robbins, W.J., Ma, R.: Vitamin deficiencies of Cerato-stomella and related fungi. Am. J. Botany 29, 835-843 (1942)

Roess, W.B., De Busk, A.G.: Properties of a basic amino acid permease in Neurospora crassa. J. Gen. Microbiol. 52, 421-432 (1968)

Sachs, L.: Statistische Auswertmethoden. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1971)

Schmitt, J.C., Brody, S.: Neurospora crassa conidial germination: Role of endogenous amino acid pools. J. Bacteriol. 124, 232-242 (1945)

Shive, W., Skinner, C.G.: Aminoacids analogues. In: R.W. Brockmann, E.P. Anderson (Hrsg). Metabolic inhibitors I, 2-73. Academic Press, New York, London (1963)

Silbernagel, St.: Aminosäuren-Transport in der Niere: Ergebnisse der Mikroperfusion. Bizu.6, 161-168 (1974)

Steward, F.C.: Effects of environment on metabolic patterns. In: Environmental control of plant growth. L.T. Evans (ed.). Academic Press, New York, London (1963)

Stewart, C.R.: The effect of carbohydrates and arginine on arginine metabolism by excised bean leaves in the dark. Plant Physiol. 55, 741-744 (1975)

Subramanian, K.N., Weiss, R.L., Davis, R.H.: Use of external biosynthetic and organellar arginine by Neurospora. J. Bacteriol. 115, 284-290 (1973)

Thinh, L.V., Griffiths, D.J.: The effect of L-arginine on the growth of heterotrophic cultures of the Emerson Strain of Chlorella. New Phytol. 73, 1087-1095 (1974)

Thwaites, W.M., Pendyala, W.M.: Regulation of amino acids in Neurospora crassa lacking basic amino acid transport activity. Biochim. Biophys. Acta 192, 455-461 (1969)

Turian, G.: Recherches sur l'action de l'acide borique sur la fructification des Sordaria. Phytopathol. Z. 25, 181-189 (1955)

Turian, G.: Déficiences du métabolisme oxidatif et différenciation sexuelle chez Allomyces et Neurospora, activité d'une DPN-deshydrogenase lactique chez Allomyces. Pathol. Microbiol. 23, 687-699 (1960)

Turian, G.: Effect conodiogene du malonate chez Neurospora crassa. Proc. 8th Intern. Congr. Microbiol., Montreal, 1962 Vol A2.9; 18, Univ. of Toronto Press, Toronto

Turian, G.: Morphogenesis in Ascomycetes. In: G.C. Ainsworth and A.S. Sussman (eds.). The fungi II 339-385. Academic Press. New York (1966)

Vigfusson, N.V., Cano, R.J.: Artificial induction of the sexual cycle of Neurospora crassa. Nature 249, 383-385 (1974)

Viswanath-Reddy, M., Turian, G.: Temperature-induced synchronous differentiation of ascogonia in Neurospora. Experentia 28, 99-100 (1972)

Viswanath-Reddy, M., Turian, G.: Physiological changes during protoperithecial differentiation in Neurospora tetrasperma. Physiol. Plant. 35, 166-174 (1975)

Weiss, R.L.; Davis, R.H.: Intracellular localisation of enzymes of arginine metabolism in Neurospora. J. Biol. Chem. 248, 5403-5408 (1973)

Weiss, R.L.: Intracellular localisation of ornithine and arginine pools in Neurospora. J. Biol. Chem. 248, 5409-5413 (1973)

Wellner, V.P., Santos, J.L., Meister, A.: Carbamyl phosphate synthetase. A biotin enzyme. Biochem. 7, 2848-2851 (1968)

West, D.J.: Effects of pH and Biotin on a circadia rhythm of conidiation in Neurospora crassa. J. Bacteriol. 123, 387-399 (1975)

Westergaard, M., Hirsch, H.M.: Environmental and genetic control of differentiation in Neurospora. Proc. Symp. Colston Res. Soc. 7, 171-183 (1954)

Westergaard, M., Mitchell, H.K.: Neurospora V. A synthetic medium favoring sexual reproduction. Am. J. Botany 34, 573-577 (1947)

Wheeler, H.E., Mc Gahen, J.W.: Genetics of Glomerella X. Genes affecting sexual reproduction. Am. J. Bot. 39, 110-119 (1952)

Wheeler, H.E., Driver, C.H., Campa, C.: Cross-and self-fertilisation in Glomerella. Amer. J. Bot. 46, 361-365 (1959)

Wiemken, A., Nurse, P.: Isolation and characterization of the amino acid pools located within the cytoplasma and vacuoles of Candia utilis. Planta 109, 293-306 (1973)

Wilson, D.M.: Physiology of sexual reproduction in Hypomyces solani f. sp. cucurbitae. VI. The effects of tyrosinase and cold treatment on cellular permeability. Phytopathology 60, 129-131 (1970)

Zolg, W., Ottow, J.C.G.: Thin-layer chromatography of arginine, lysine and ornithine decarboxilase activity among Pseudomonas spp. and Enterobacteriaceae. Microbios 10, 225-231 (1974)

Zonneveld, B.J.M.: Morphogenesis in Aspergillus nidulans. The significance of α-1,3-glucan of the cell wall and α-1,3-glucanase for cleistothecium development. Biochim. Biophys. Acta 273, 174-187 (1972)

CURRICILUM VITAE

5.4.1945	geboren in Wien, Oesterreich, als Sohn von Dr. med. Franz und Gudrun Bahn (geb. Hoffmann).
1951-1955	Besuch der Volksschule in Mondsee, Oesterreich.
1955-1964	Besuch des humanistischen akademischen Gymnasiums in Salzburg.
1964	Reifeprüfung.
1964-1971	Studium an der Hochschule für Bodenkultur in Wien, Abteilung für Lebensmittel- und Gärungstechnologie.
1970-1971	Diplomarbeit am Institut für angewandte Mikrobiologie unter der Leitung von Prof. Dr. J. Meyrath.
1971	Erlangung des akademischen Grades Diplom-Ingenieur.
1971	Wissenschaftlicher Angestellter der Ruhr-Universität Bochum, Institut für Allgemeine Botanik, Arbeitsgruppe Biochemie der Morphogenese. Arbeit an der Dissertation unter der Leitung von Prof. Dr. B. Hock.